

Е.А. Николайчик

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА

курс лекций

Минск 2002

1. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ. РЕГУЛЯЦИЯ НА УРОВНЕ ТРАНСКРИПЦИИ	1
1.1 ОПЕРОННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ	2
<i>lac оперон</i>	2
1.2 КАК РАБОТАЮТ РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ?	3
<i>Связывание регуляторных белков с ДНК</i>	3
1.3 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ С РНК-ПОЛИМЕРАЗой	4
1.4 АРАБИНОЗНЫЙ ОПЕРОН	6
1.5 ТРИПТОФАНОВЫЙ ОПЕРОН	7
<i>Аттенуация</i>	8
1.6 РЕГУЛЯЦИЯ НА СТАДИИ ТЕРМИНАЦИИ. АНТИТЕРМИНАЦИЯ.....	9
2. ФОСФОТРАНСФЕРАЗНАЯ СИСТЕМА.....	10
<i>Катаболитная репрессия</i>	13
<i>bgl оперон – ФТС и антитерминация</i>	14
3. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ СИГМА-ФАКТОРЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ	14
<i>σ-факторы бактериофагов. Каскадная регуляция экспрессии генов</i>	16
<i>groS</i>	16
<i>groE</i>	17
4. ТЕПЛОВОЙ ШОК, ФОЛДИНГ И ДЕГРАДАЦИЯ БЕЛКОВ.....	19
<i>Молекулярные шапероны</i>	19
<i>АТФ-зависимые протеазы</i>	21
5. ХОЛОДОВОЙ ШОК.....	24
6. СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ	26
ДВУХКОМПОНЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ	27
СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ГИСТИДИНОВЫХ ПРОТЕИНАКИНАЗ.....	29
<i>Каталитическое киназное ядро</i>	30
<i>HPt-домены</i>	30
<i>Сенсорный домен</i>	30
<i>Линкерный домен</i>	30
СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ РЕГУЛЯТОРОВ ОТВЕТА.....	30
<i>Активности и структура</i>	30
<i>Регуляторный домен</i>	31
<i>Эффекторный домен</i>	31
АКТИВАЦИЯ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ.....	31
АРХИТЕКТУРА РЕГУЛЯТОРНЫХ СИСТЕМ.....	32
<i>Фосфотрансляционные системы</i>	32
РЕГУЛЯТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ	33
<i>Регуляция активности ГК</i>	33
<i>Регуляция дефосфорилирования РО</i>	34
<i>Другие способы регуляции</i>	34
7. ХЕМОТАКСИС	34
7.1 УСТРОЙСТВО И ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА БАКТЕРИЙ.....	34
<i>Регуляция синтеза жгутикового аппарата</i>	35
7.2 ЧТО ТАКОЕ ХЕМОТАКСИС И КАК ОН РЕАЛИЗОВАН У БАКТЕРИЙ?	36
7.3 БЕЛКОВЫЙ АППАРАТ ХЕМОТАКСИСА	37

Рецепторы хемотаксиса.....	37
Как внеклеточный стимул транслируется во внутриклеточный сигнал?	38
Цитоплазматические сигнальные белки и регуляторный механизм хемотаксиса	39
Метилазы хемотаксиса и сенсорная адаптация.....	39
8. УТИЛИЗАЦИЯ АЗОТА	41
9. КИСЛОРОДНЫЙ СТРЕСС И РЕДОКС КОНТРОЛЬ.	43
АКТИВНЫЕ РАДИКАЛЫ: ИХ ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ И МЕХАНИЗМ ИНАКТИВАЦИИ	43
Причина окислительного стресса.....	43
Механизмы окислительных повреждений клетки.....	44
ЗАЩИТА ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА.	44
<i>SoxRS</i> регулон	44
<i>OxyR</i> регулон.....	45
АДАПТАЦИЯ К АНАЭРОБИОЗУ	45
<i>FNR</i> как сенсор кислорода	45
<i>ArcB</i>	46
10. ДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ.....	47
Регуляция клеточного цикла у <i>CAULOBACTER CRESCENTUS</i>	59
11. СПОРУЛЯЦИЯ У <i>BACILLUS SUBTILIS</i>.	62
Морфология споруляции	62
Как принимается решение о начале споруляции?	63
Роль активаторов транскрипции на разных стадиях споруляции.....	64
12. МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ КОММУНИКАЦИИ. QUORUM SENSING.....	66
Синтез АГСЛ.....	67
Регуляция синтеза экзоферментов у <i>Erwinia</i>	68
Роль АГСЛ-сигналов в экологии бактериальных популяций. Кросс-сигналы (и ингибирование антибиотиками).....	69
13. СЕКРЕЦИЯ БЕЛКОВ	69
СЕКРЕТОРНЫЙ АППАРАТ ПЕРВОГО ТИПА.	71
СЕКРЕТОРНЫЙ АППАРАТ ВТОРОГО ТИПА (GSP).....	72
<i>Ses</i> система.....	72
Основная терминальная ветвь GSP	74
Регуляция GSP.....	75
СЕКРЕТОРНЫЙ АППАРАТ III ТИПА	76
1.1. Специфика аппарата секреции III типа и его компоненты.....	76
1.2. Субстраты аппарата секреции III типа.	77
1.3. Организация и регуляция генов, кодирующих белки аппарата секреции III типа.....	78
Секреторные шапероны.....	79
СЕКРЕТОРНЫЙ АППАРАТ IV ТИПА.....	80
14. СТРОГИЙ ОТВЕТ	82
15. SOS ОТВЕТ	83
<i>SOS</i> -мутагенез.....	84
16. РЕГУЛЯЦИЯ СТАБИЛЬНОСТИ МРНК.....	84
БАКТЕРИАЛЬНЫЕ РНКАЗЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ДЕГРАДАЦИИ МРНК	86
РНКазы E.....	86
РНКазы III.....	86

<i>Полинуклеотидфосфорилаза</i>	<i>86</i>
<i>РНКаза II</i>	<i>87</i>
<i>Мультибелковые комплексы деградации РНК.....</i>	<i>87</i>
<i>РНК-хеликазы в деградации РНК.....</i>	<i>87</i>
<i>Полиаденилирование оказывает противоположный эффект на стабильность бактериальных и эукариотических мРНК.....</i>	<i>88</i>

1. Основные принципы регуляции экспрессии генетической информации.

Регуляция на уровне транскрипции

Несмотря на кажущуюся простоту организации, клеткам прокариот необходимо иметь не менее, а, скорее, более сложные, чем у многих эукариот, системы контроля основных жизненных функций. И это не удивительно, если принять во внимание тот факт, что каждая клетка бактерий является полноценным организмом, полностью самодостаточным, тогда как клетки большинства многоклеточных организмов входят в состав специализированных тканей и, следовательно, выполняют только какую-то часть жизненно важных для организма функций.

Клетки микроорганизмов находятся в непосредственном контакте с окружающей средой, зачастую на наш взгляд весьма далекой от оптимальной для поддержания жизни. Условия среды не являются постоянными, следовательно, бактерии должны обладать способностью либо быть всегда готовыми ко всем подстерегающим их неожиданностям, либо “подстраиваться” к изменяющимся условиям. Иными словами, принципиально возможны две стратегии существования в изменяющихся условиях. Первая - постоянно быть во всеоружии, держа наготове все функции, которые когда-либо могут пригодиться. В таком случае значительная часть ресурсов организма большую часть времени будет расходоваться впустую на поддержание функций, не нужных в настоящий момент. Вторая стратегия - “включать” определенные функции только тогда, когда они необходимы. Как вы уже, наверное, знаете, именно такой подход используется живыми организмами в большинстве случаев. Такая стратегия, на первый взгляд, должна приводить к значительной экономии ресурсов организма. Однако при таком подходе возникает необходимость в системах детекции сигналов и регуляции метаболизма, обеспечивающих максимально быстрое “включение” соответствующих метаболических путей в ответ на изменение условий среды и их “отключение”, как только в соответствующих функциях отпадет необходимость. Если такие системы были бы слишком сложными, организм должен был бы слишком много ресурсов расходовать на поддержание соответствующего генетического аппарата, экспрессию необходимых регуляторных белков и т.д., что свело бы на нет всю экономию.

Как видите, жизнь простых организмов не так уж и проста, и этот курс лекций как раз и пытается показать, как микроорганизмы решают свою основную проблему - регуляцию метаболизма в меняющихся условиях среды.

Поскольку основную функциональную нагрузку при взаимодействии любого организма с внешней средой несут белки (либо непосредственно, либо посредством своих ферментативных активностей), а информация о структуре и количестве белков кодируется генетическим аппаратом клетки, возможности для регуляции имеются на всем пути экспрессии кодируемой организмом информации. Иными словами, регуляция возможна как на пути от ДНК к РНК (при транскрипции), так и от РНК к белку (при трансляции). В обоих случаях экономия ресурсов организма достигается за счет выключения очень энергоемких процессов биосинтеза макромолекул - белка либо РНК (и, следовательно, белка). Кроме того, возможна также регуляция на уровне белков (как правило, аллостерических ферментов, меняющих свою активность при взаимодействии с низкомолекулярными веществами, напр., конечными продуктами какого-то биосинтетического пути). Здесь происходит экономия энергии при ингибировании энергоемких ферментативных реакций.

схема: уровни регуляции (действительно нужен простой рисунок):

I- дотранскрипционный (метилование ДНК) - cell cycle; спирализация хроматина у эукариот

II – транскрипционный:

а) инициация (промоторы+регуляторные белки)

б) терминация (аттенуация и антитерминация)

III – посттранскрипционный:

а) стабильность мРНК (rpoS)

б) инициация трансляции (cold shock)

IV – посттрансляционный: регуляция метаболизма посредством белок-белковых взаимодействий и модификации белков; аллостерическая регуляция (хемотаксис)

A priori можно предположить, что именно регуляция на стадии инициации транскрипции будет наиболее эффективной – регуляция на начальных этапах длинного пути экспрессии генетической информации явно приведет к наибольшей экономии ресурсов клетки. Наверное, именно поэтому транскрипционная регуляция является на настоящий момент наиболее изученной (хотя, скорее всего, этот уровень регуляции действительно наиболее часто используется клеткой). С нее мы и начнем.

1.1 Оперонная организация бактериальных генов

Исторически сложилось так, что первые работы по регуляции метаболизма были сделаны при изучении утилизации лактозы бактериями *Escherichia coli*. Для описания лактозного метаболизма Жакоб и Моно в 1961 г. ввели термин "оперон". Оперон, как вы помните, представляет собой группу из двух или более структурных генов (иногда говорят и о моноцистронных, т.е. содержащих один ген, оперонах), кодирующих тесно связанные между собой функционально белки, совместно транскрибируемых и находящихся под общим контролем. Такой контроль осуществляется продуктом регуляторного гена, действие которого осуществляется через оператор находящийся в непосредственной близости к промотору. Как промотор, так и оператор являются короткими (пару десятков нуклеотидов) последовательностями ДНК, предшествующими контролируемому структурным генам.

Рассмотрим структуру абстрактного оперона подробнее. Он состоит из следующих элементов:

1. Промотор - участок ДНК, с которым происходит связывание РНК-полимеразы и который определяет точку начала транскрипции. Типичный пример - TTGACA - 17 bp - TATAAT. В зависимости от типа промотора (а точнее, от типа распознающей его сигма - субъединицы РНК полимеразы) конкретная последовательность промотора варьирует.

2. Operator - участок связывания регуляторного белка. Размер - около 20 bp. Располагается в непосредственной близости к промотору или же перекрывается с ним. В случае негативных регуляторов, или репрессоров, оператор, как правило, располагается непосредственно за промотором, или перекрывается с ним. В случае позитивных регуляторов (активаторов) оператор обычно располагается перед промотором. В любом случае связывание регуляторного белка с оператором меняет частоту инициации транскрипции. У многих (возможно, у большинства) оперонов имеется не один, а несколько сайтов связывания с регуляторными белками, которые не обязательно располагаются рядом и могут вообще находиться по разные стороны от промотора. В этих случаях термин "оператор" в классическом смысле становится неудобным, в связи с чем сейчас чаще просто говорят о сайтах связывания регуляторов.

3. Структурные гены. Кодируют белки, непосредственно производящие фенотипический эффект. Именно для контроля их экспрессии, собственно, и существуют оперонные структуры вместе со своими регуляторами.

4. Терминатор транскрипции. Здесь заканчивается синтез мРНК.

Не входит в оперон, но является необходимой частью регуляторной системы ген-регулятор, кодирующий регуляторный белок, связывающийся с оператором. Ген-регулятор может находиться рядом с контролируемым им опероном, но часто располагается совсем в другом участке хромосомы. Почти всегда у гена-регулятора свой промотор и терминатор.

В регуляции участвуют, как правило, и низкомолекулярные вещества-эффекторы, являющиеся либо индукторами, либо корепрессорами структурных генов.

В зависимости от влияния на их работу низкомолекулярных молекул-эффекторов различают индуцибельные и репрессибельные (-руемые) опероны. В зависимости от эффекта связывания регуляторного белка с оператором опероны могут иметь негативный или позитивный контроль. Т. о., можно выделить четыре типа оперонов:

(ТИПЫ ОПЕРОНОВ)

(принципы работы в каждом случае)

lac оперон

lacZ - гидролиз до глюкозы и галактозы

lacY - галактозидпермеаза

lacA - галактозидтрансацетилаза

без лактозы - следовые колич трех белков
с лактозой к-во стр белков увеличивается в 1000 раз.

ген-регулятор лактозного оперона - lacI, - кодирует белок-репрессор. В активной форме это тетрамер. Клетки с инактивацией lacI конститутивны по синтезу всех трех ферментов.

Если в клетке появляется индуктор, он конкурирует с оператором за молекулы репрессора. Связывание индуктора с репрессором освобождает оператор и позволяет РНК-полимеразе начать транскрипцию. В качестве индуктора может выступать лактоза (вернее, аллолактоза) и еще несколько сахаров и их неметаболизируемых аналогов. Даже в отсутствие индуктора базовая активность галактозидпермеазы достаточна, чтобы обеспечить транспорт индуктора в клетку.

Однако одно только снятие репрессии недостаточно для обеспечения наблюдаемого тысячекратного увеличения транскрипции генов оперона. Как оказалось, lac-оперон находится также и под влиянием позитивной регуляции. Непосредственно перед промотором lac-оперона располагается сайт связывания с активаторным белком CAP (Catabolite Activator Protein, CRP) или БАК (БРЦ). Связывание этого белка со своим оператором приводит к усилению транскрипции оперона. CAP является апоиндуктором, и для связывания с ДНК должен образовать комплекс с цАМФ. Комплекс CAP-сАМФ играет роль в явлении, называемом катаболитной репрессией или глюкозным эффектом. Суть этого явления, которое мы будем более детально рассматривать позднее, заключается в том, что в присутствии глюкозы утилизация целого ряда источников углерода (в т.ч. и лактозы) ингибируется. Причиной этого является снижение концентрации цАМФ, и следовательно, комплекса CAP-сАМФ, активирующего транскрипцию.

Диауксия

1.2 Как работают регуляторные белки?

Связывание регуляторных белков с ДНК

Чтобы понять действие регуляторного механизма, необходимо знать, как происходит взаимодействие белка-регулятора с оператором.

Вспомните структуру ДНК.

- большой и малый желобки
- Атомы, лежащие вдоль краев пар оснований "смотрят" в эти желобки. Каждой паре оснований соответствует свой набор химических групп, который может узнавать белок. (это не те группы, которые участвуют в комплементарном спаривании оснований). Все ДНК-связывающие белки имеют выступы, встраивающиеся в большой (как правило) желобок и "читающие" последовательность оснований ДНК.

1. Оператор. Все о. почти симметричны (палиндромы). Разные сайты, взаимодействующие с одним и тем же белком, сходны, но не идентичны. Различия в последовательности обеспечивают различное сродство белков к различным операторным сайтам.

2. Репрессор. Репрессор обязан иметь ДНК-связывающий домен. В одном из наиболее распространенных случаев его основу составляют две α -спирали, расположенные под углом друг к другу т.о., что одна из спиралей ложится в большую бороздку ДНК. Кроме того, часть белков имеет на N-конце гибкую "руку", охватывающую молекулу ДНК со стороны, противоположной узнающей спирали. Т.о., белок может прочно связаться с ДНК только в том случае, если имеется соответствие между боковыми цепями АК узнающей альфа-спирали и функциональными группами ДНК, экспонированными в большой желобок. Очень часто ДНК-связывающие белки имеют второй домен, отвечающий за димеризацию белка. При наличии таких доменов сила связывания репрессора с ДНК резко возрастает. Именно поэтому операторы имеют структуру палиндрома - с каждой половиной оператора взаимодействует одна молекула белка, причем связывание одной молекулы ускоряет

связывание второй, в результате сила связывания регуляторного белка с оператором возрастает. Такое явление называется кооперативностью. Более того, зачастую операторные сайты располагаются рядом, и тогда связывание одного димера белка может кооперативно способствовать связыванию второго димера.

Результатом кооперативного связывания является сигмоидная кривая зависимости эффективности транскрипции от концентрации репрессора (или активатора). Это обеспечивает легкость переключения регуляторной системы из одного состояния в другое.

Каков же результат связывания регуляторного белка с оператором? В случае репрессоров такое связывание либо создает стерическое затруднение для связывания РНК-полимеразы с промотором либо препятствует дальнейшему продвижению РНК-полимеразы в тех случаях, когда оператор расположен после промотора. В случае активаторов возможны несколько механизмов:

- непосредственное взаимодействие активатора с полимеразой, обеспечивающее более сильное связывание с промоторной областью;

- облегчение локального расплетания ДНК в области промотора (необходимого для инициации транскрипции) либо за счет внесения изгиба в ДНК либо за счет увеличения отрицательной суперскрученности.

Тщательный анализ ряда оперонов *E. coli* показал, что часть белков, первоначально описанных как репрессоры, может работать и активаторами (и наоборот). Два классических примера – *cI* и БАК. Различный эффект связывания одного и того же белка с промоторной областью объясняется просто. Репрессия происходит при связывании белка там, где он может предотвратить связывание РНК-П или активатора. Для оказания же активаторного действия белок должен обладать способностью связываться с РНК-П (обычно это слабое, но специфическое связывание) и иметь сайт связывания с ДНК в непосредственной близости к промотору.

Lac репрессор

тетрамер

кооперативное связывание с двумя операторами

10 копий на клетку

4000 мутантов JH Miller'a

Gal репрессор

димер

похож на LacI, но короче с С-конца (участвующего в формировании тетрамера у LacI)

для репрессии необходимо связывание двух димеров Gal репрессора и гистонподобного белка HU между ними.

Почему димер?

1.3 Взаимодействие регуляторных белков с РНК-полимеразой

Бактериальные промоторы содержат специфические элементы, распознаваемые холоферментом РНК-полимеразы. Гексамеры -10 и -35 распознаются специфическими поверхностями областей 2 и 4 σ -субъединицы РНК-полимеразы. Как правило, одних этих гексамеров оказывается недостаточно. Расположенные выше элементы входят в контакт с карбокси-концом α -субъединицы РНК-полимеразы. Некоторые промоторы, к тому же, имеют расширенный -10 элемент, контактирующий с дополнительным районом области 2 σ -субъединицы РНК-полимеразы. Разные промоторы имеют различные комбинации этих элементов, и в ряде случаев узнавания этих дополнительных последовательностей оказывается достаточно для полноценного связывания РНК-полимеразы, но в большинстве случаев для нормальной инициации транскрипции необходимо присутствие активатора. Активатор может быть необходим для начального связывания РНК-полимеразы с промотором, для ее изомеризации из закрытого в открытый комплекс, либо для освобождения промотора (начала собственно транскрипции).

Две модели были предложены для объяснения действия активаторов. В соответствии с первой из них активатор вступает в непосредственный контакт с РНК-П. Вторая модель предполагает отсутствие непосредственного контакта с РНК-П; по этой модели активатор изменяет конформации промоторной ДНК, облегчая инициацию транскрипции. Вторая модель довольно часто привлекалась для объяснения

механизма действия БАК, но в настоящее время большинство фактов свидетельствует в пользу первой модели даже для этого белка.

В соответствии с местом контакта активатора с РНК-П активаторы можно подразделить на следующие группы (Рис. 1.1.)

Контактирующие с карбокси-концом α -субъединицы РНК-П (α CTD)

Наиболее изученным представителем этого класса является БАК. Сайт связывания для этого белка располагается перед -35 последовательностью. Интересно, что сайты связывания активаторов этого класса располагаются на различных расстояниях от промотора. Это объясняется структурой α CTD. Эта субъединица РНК-полимеразы состоит из двух доменов, соединенных между собой гибким линкером. N-концевой домен контактирует с другими субъединицами РНК-полимеразы и поэтому жестко зафиксирован, тогда как α CTD достаточно подвижен и поэтому может контактировать с активаторами, удаленными на различное расстояние. Естественно, это возможно, только если активатор контактирует с ДНК с той же стороны, что и РНК-П. Поэтому БАК может активировать транскрипцию, связываясь с ДНК в области -61 (как у *lac* промотора), либо в позициях -71 , -81 , -91 .

Какова же роль α CTD в этих процессах? Эксперименты с замещением аминокислотных остатков показывают, что для активации необходима ДНК-связывающая поверхность, а также некоторые основания, необходимые для взаимодействия с конкретным активатором. Какова же роль такого взаимодействия? В экспериментах по замещению α CTD карбокси-концевым доменом репрессора фага λ (*cI*) было показано, что такая гибридная *cI*- α субъединица способна обеспечивать активацию промотора при взаимодействии с полноразмерным *cI* на промоторе с сайтом связывания с *cI*. Поскольку структура *cI* совершенно отлична от таковой α CTD, это свидетельствует о том, что любой дополнительный контакт с промоторной областью способен усиливать транскрипцию, не изменяя локальной структуры ДНК.

Активаторы, контактирующие с σ^{70} -субъединицей РНК-полимеразы

А точнее, с ее областью 4. Наиболее изучен пример белка *cI* бактериофага λ . В качестве активатора этот белок связывается с сайтом, перекрывающимся с -35 элементом промотора P_{RM} . В отличие от предыдущего класса активаторов позиция сайта связывания в данном случае определяется достаточно жестко (поскольку позиция σ^{70} по отношению к промотору тоже жестко фиксирована).

Активаторы, контактирующие с другими областями РНК-полимеразы

Принцип действия рассмотренных выше примеров активаторов основан на стабилизации уже существующих контактов с ДНК двух поверхностей РНК-П. Это наиболее простой путь, но имеются примеры и контактов активаторов с другими участками (и субъединицами) РНК-П. Тот же БАК контактирует с N-концевым доменом α -субъединицы в тех случаях, когда сайт связывания перекрывается с областью -35 промотора. Белок DnaA активирует промотор P_R фага λ за счет контактов с β' субъединицей РНК-П.

Активаторы, имеющие два контакта с РНК-П.

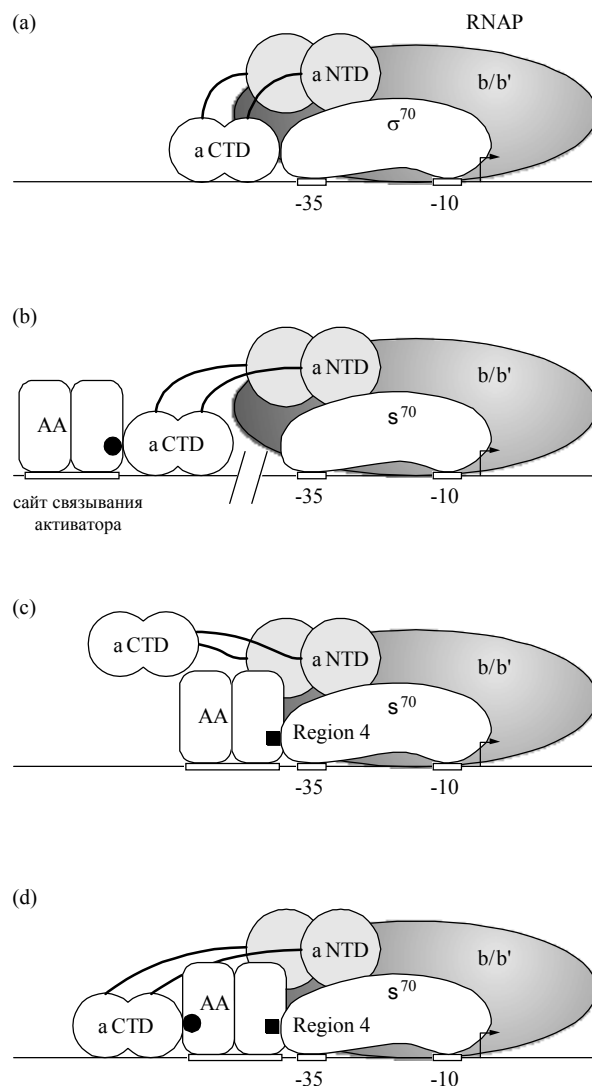


Рис. 1.1. Контакты активатора транскрипции с РНК-полимеразой

В тех случаях, когда активатор связывается с областью –35 промотора, α CTD не может образовать контакт с ДНК в обычном месте и смещается выше. В некоторых случаях в такой позиции возможно образование дополнительного контакта α CTD с активатором. Примером активатора, образующего такой двойной контакт, является FNR (активатор экспрессии фумарат редуктазы и нитрат редуктазы). В случае этого белка одна субъединица его димера контактирует с σ -фактором РНК-П, а другая субъединица контактирует со смещенным α CTD. Таким образом, каждая субъединица FNR контактирует со своей областью РНК-П. Такая же ситуация характерна для части тех БАК-зависимых промоторов, у которых сайт связывания БАК перекрывается с областью –35. Как уже говорилось выше, в таких случаях одна субъединица БАК контактирует с N-концевым доменом α -субъединицы РНК-П. Другая же субъединица БАК может образовывать дополнительный контакт с α CTD.

Активаторы, действующие путем изменения конформации промотора.

Примером такого активатора является белок MerR транспозона Tn501. Димер этого белка связывается с сайтом, расположенным между –10 и –35 областями промотора. Связывание ионов ртути вызывает конформационное изменение, заключающееся в раскручивании ДНК-мишени, что приводит к правильному расположению –10 и –35 областей промотора и соответственно позволяет связаться РНК-полимеразе. Еще одним примером такого регулятора является SoxR (регулятор окислительного стресса, который мы будем рассматривать позднее). К этому же классу относятся активаторы, связывание которых с ДНК вводит в структуру последней резкий изгиб. Нет полной ясности с механизмом работы таких активаторов транскрипции. Здесь возможны два варианта – контакт с «обратной» стороной РНК-П и конформационное изменение структуры ДНК.

Наконец, существуют промоторы, зависящие от двух (и более) активаторов. Такая множественная зависимость обычно привязывает активность промотора к различным физиологическим сигналам. В таких ситуациях возможны 4 механизма совместного действия двух регуляторов:

- связывание с ДНК одного активатора может зависеть от другого (и наоборот). Несмотря на простоту, примеров такого рода для прокариот не описано (описаны для эукариот);
- связывание одного активатора может приводить к перемещению другого активатора из пассивной позиции в положение, из которого он может взаимодействовать с РНК-П. Пример – БАК и MalT на *malK* промоторе: - связывание БАК перемещает MalT
- активаторы могут образовывать независимые контакты с РНК-П. В таких случаях один активатор связывается в районе –35 области и контактирует с σ , а другой – upstream, и контактирует с α CTD.
- роль второго активатора может заключаться в предотвращении действия репрессора.

Promoter occlusion

1.4 Арабинозный оперон

В качестве примеров систем с более сложным контролем рассмотрим *ara* оперон *E. coli*. Рассмотренный ранее *lac* оперон можно считать примером “простой” регуляции. Хотя в случае *lac* оперона действуют два белка-регулятора, а именно осуществляющий негативный контроль репрессор LacI и активатор транскрипции БАК, действие этих белков друг от друга не зависит, и мы фактически имеем две простых регуляторных системы. В *ara* опероне один и тот же белок (продукт гена *araC*) может выполнять как репрессорную, так и активаторную функции.

Всего за утилизацию арабинозы отвечает 6 генов – пять структурных и один регуляторный (*araC*). Три гена образуют оперон, *araBAD*, который и регулируется продуктом гена *araC*. Ген *araC* располагается перед опероном *araBAD*, но отделен от него 147 парами оснований и считывается в противоположном направлении. Еще два гена, *araE* и *araF* не сцеплены ни друг с другом, ни с кластером *araCBAD*, т.е. располагаются в совершенно другом районе хромосомы. Тем не менее, эти два гена подвержены той же системе регуляции, т.е. в их промоторной области имеются сайты связывания продукта *araC*. Такая организация называется регулоном. Иными словами, регулон – группа генов и (или) оперонов, как правило, необходимых для выполнения одной физиологической функции, не сцепленных между собой, но находящихся под общим контролем.

Генетическое изучение арабинозного оперона указывало на то, что ген *araC* должен кодировать как репрессор, так и активатор транскрипции. Оказалось, что непосредственно продукт является репрессором, но присоединение индуктора (арабинозы) не только инактивирует репрессор, но и

превращает его в индуктор. Эти две формы продукта *araC* называются соответственно C^{rep} и C^{ind} . Две формы белка *C* имеют разные сайты связывания в области между генами *araC* и *araB*. Кроме того, в этой же области располагается сайт связывания БАК и, конечно же, промоторы гена *araC* и оперона *araBAD*.

Эта область ДНК организована следующим образом

Сайт связывания БАК располагается между двумя промоторами, причем связывание комплекса БАК-цАМФ необходимо для инициации транскрипции в обоих направлениях. Сайт связывания C^{rep} перекрывается с промотором гена *araC*, поэтому связывание C^{rep} ингибирует транскрипцию своего собственного гена. Таким образом, в отсутствие индуктора транскрипция гена *araC* поддерживается на очень низком базальном уровне, достаточном только для обеспечения собственной репрессии. Появление индуктора (арабинозы) вызывает отсоединение репрессора и связывание его с активаторным сайтом, располагающимся между сайтом связывания БАК и промотором оперона *araBAD*. Таким образом снимается репрессия с *araC* и обеспечивается синтез больших количеств его продукта, который, связываясь с арабинозой, активирует транскрипцию оперона *araBAD*.

Т.о., в случае транскрипции “влево” мы имеем точную копию модели регуляции *lac* оперона. Репрессор C^{rep} ингибирует транскрипцию *araC* фактически так же, как LacI ингибирует транскрипцию *lac* оперона. И точно так же добавление индуктора, в данном случае арабинозы, снимает реессию. Также аналогично действует и активирующий комплекс БАК-цАМФ по отношению к транскрипции “влево”. Однако, в случае транскрипции “вправо” ситуация более сложная, поскольку здесь действуют уже два активаторных белка, тот же БАК-цАМФ и C^{ind} . Сайт связывания C^{ind} расположен таким образом, что, связавшись с ДНК, этот белок может непосредственно контактировать с РНК-полимеразой, что и вызывает активацию транскрипции. Но поскольку сайт связывания C^{ind} расположен между промотором и БАК-связывающим сайтом, комплекс БАК-цАМФ располагается слишком далеко, чтобы непосредственно контактировать с РНК-полимеразой, собирающейся читать вправо.

Как же БАК осуществляет регуляцию в данном случае? Дело в том, что пример с *ara* опероном не является исключением. БАК имеет два типа расположения относительно промотора. Первый – стандартный для активаторов транскрипции – прямо перед промотором (например, в положении -72...-50 у *lac* оперона или -50...-23 у *gal* оперона), что позволяет белку непосредственно контактировать с РНК-полимеразой. Но у многих промоторов сайт связывания БАК располагается значительно дальше. В случае *ara* оперона БАК связывается в положении -107...-78. Есть и другие опероны с удаленным расположением БАК-связывающего сайта. Вопрос о том, как действует БАК, остается открытым. Существуют две модели. Первая объясняет действие БАК через белковые взаимодействия. В принципе, даже не очень сильное взаимодействие между двумя белками может оказаться достаточным для существенного усиления связи РНК-полимеразы с промотором. Проблемой здесь является то, что даже в случае *gal* и *lac* промоторов взаимодействие должно происходить по-разному, а в случае *ara* промотора должны взаимодействовать три белка. Вторая модель предполагает, что эффект БАК определяется целиком его связыванием с ДНК. В соответствии с этой моделью РНК-полимераза не может сама обеспечить первоначальное плавление ДНК в области промотора, в пользу чего говорит тот факт, что ни один из БАК-зависимых промоторов не имеет “хорошей”, то есть близкой к канонической, -35 последовательности. Экспериментально установлено, что связывание белка БАК с ДНК вносит в нее изгиб почти под прямым углом, что возможно только в случае серьезного изменения структуры ДНК в этом районе. Предполагается, что это изменение структуры облегчает плавление ДНК в промоторной области и, следовательно, инициацию транскрипции.

1.5 Триптофановый оперон

репрессибельный оперон

Оба оперона (*lac* и *ara*), рассмотренные нами ранее, являются **индуцируемыми (индуцибельными)**. Как мы уже обсуждали на первой лекции, индуцируемыми обычно являются катаболитные опероны. И такой тип регуляции естественен, поскольку обеспечивает синтез ферментов, отвечающих за утилизацию какого-либо питательного субстрата только в случае наличия этого субстрата. В другой ситуации, когда клетке нужно синтезировать какое-нибудь вещество и поддерживать его концентрацию на постоянном уровне, используются **репрессибельные (репрессируемые)** опероны. Рассмотрим такой тип регуляции на примере триптофанового оперона.

Триптофановый оперон состоит из 5 структурных генов, кодирующих три фермента, превращающих хоризмовую кислоту в триптофан. (Г1 с.190). Биосинтез триптофана представляет собой классический случай ретроингибирования, то есть ингибирования активности одного из первых ферментов какого-либо биосинтетического пути конечным продуктом. Но кроме участия в ретроингибировании триптофан выполняет также и функцию корепрессора, активируя белок-репрессор.

Репрессор кодируется не связанным с *trp* опероном геном *trpR*. В условиях достаточных количеств триптофана комплекс корепрессор-TrpR связывается с оператором и ингибирует транскрипцию. (пару слов о генетической номенклатуре - TrpR vs *trpR*). Инактивация репрессора приводит к усилению транскрипции приблизительно в 70 раз. Это относительно небольшая разница (сравните с 1000-кратной индукцией *lac* оперона). Но такая кажущаяся неэффективность с лихвой компенсируется дополнительными уровнями регуляции - во-первых, ретроингибированием, а во-вторых, феноменом, называемым аттенуацией.

Аттенуация.

Между промоторной областью и первым структурным геном оперона имеется достаточно протяженный участок ДНК, к тому же кодирующий небольшой пептид. Эта последовательность ДНК называется лидером, а пептид - лидерным. И, как оказалось, лидер необходим для еще одного механизма регуляции экспрессии, называемого аттенуацией. Это явление достаточно широко распространено в биосинтетических оперонах, и его сущность заключается в следующем. За лидерным пептидом располагается шпильчатая структура, являющаяся терминатором, на котором в условиях избытка триптофана транскрипция оперона благополучно и заканчивается, не достигнув структурных генов. Лидерный пептид богат триптофановыми кодонами. В условиях недостатка триптофана концентрация нагруженных триптофаном аминоацил-тРНК не высока, и рибосома "притормаживает" на триптофановых кодонах, не давая возможности образоваться терминаторной шпильке. В результате транскрипция продолжается и с рамок структурных генов считывается РНК. Лидерная область, также называемая аттенуатором, занимает 162 н.п. между стартом транскрипции и первым кодоном *trpE* гена. Аттенуатор является барьером для транскрипции. Активной структурой здесь выступает р-независимый терминатор - короткий GC богатый палиндром, непосредственно за которым следуют 8 остатков U (не забудьте, что сейчас мы говорим о структуре РНК). В присутствии триптофана ~90% РНК терминируется здесь (что вместе с репрессией дает приблизительно 600-кратное снижение транскрипции в присутствии триптофана).

Рассмотрим структуру аттенуатора подробнее

Аттенуатор содержит RBS, за которым следует рамка считывания, способная кодировать пептид длиной 13 аминокислот. Какова функция этого пептида? В положениях 9 и 10 он содержит два триптофановых остатка. В условиях недостатка триптофана рибосомы останавливаются, достигнув триптофановых кодонов, что препятствует формированию терминаторной шпильки. Лидерная РНК может образовывать три шпильки, а поскольку их последовательность перекрывается, возможны две альтернативные структуры. В первой из них участок 1 спаривается с участком 2, а участок 3 с участком 4. Таким образом, формируется три шпильки. Если же не дать участку 1 спариться с участком 2, то участок 2 может спариться с участком 3. В таком случае участку 4 спариваться не с чем, и терминаторная шпилька не образуется.

Следующий рисунок показывает, каким образом положение рибосомы при трансляции лидерного пептида влияет на образование шпильчатых структур таким образом, что терминация происходит только при наличии триптофана. Как вы знаете, у прокариот процессы транскрипции и трансляции неразобщены, то есть трансляция мРНК начинается, как только синтезированы первые несколько десятков пар оснований. Поскольку стоп-кодон лидерного пептида находится как раз между комплиментарными участками 1 и 2, рибосома, дойдя до конца лидерного пептида, экранирует большую часть участка 2, не давая формироваться полноразмерной шпильке 2-3, поэтому терминаторная шпилька формируется беспрепятственно. В случае же голодания по триптофану рибосома с пустым А-сайтом притормаживает на триптофановых кодонах в ожидании триптофановой аминоацил-тРНК, что позволяет сформироваться полноразмерной шпильке 2-3. Соответственно, терминаторная шпилька в таких условиях образоваться не может. Если же клетка голодает по одной из аминокислот, чьи остатки располагаются в начале лидерного пептида, формирование шпильки 1-2 блокирует формирование шпильки 2-3 и, следовательно, позволяет сформироваться терминаторной шпильке 3-4.

Аттенуация - широко распространенное явление, встречающееся, как минимум, в шести оперонах биосинтеза аминокислот. В двух из них наблюдается явление мультивалентной репрессии - *thr* оперон дерепрессируется при голодании по *thr* и *ile*, а *ilv* оперон - по *ile*, *leu* и *val*.

Наконец, следует заметить, что формально в случае аттенуации рибосому можно считать активатором транскрипции, а аминоацил-тРНК - корепрессором.

1.6 Регуляция на стадии терминации. Антитерминация

Итак, на примере аттенуации в триптофановом опероне мы только что рассмотрели регуляцию экспрессии на стадии терминации транскрипции. На первой лекции на примере лактозного оперона мы рассматривали регуляцию на стадии инициации транскрипции. При сравнении этих двух примеров может сложиться впечатление, что регуляция на стадии терминации - очень сложный процесс. Но это далеко не всегда так. Другой механизм регуляции на стадии терминации, называемый **антитерминацией**, устроен проще. В случае антитерминации регуляторную функцию выполняет один белок, называемый антитерминатором. Этот белок предотвращает терминацию транскрипции и позволяет считываться генам, расположенным за терминатором, выполняя, таким образом, активаторную функцию. Следует сразу заметить, что, в отличие от регуляторов транскрипции, действующих на стадии инициации, антитерминаторы не взаимодействуют с кофакторами, а либо являются активными постоянно, либо их активность модулируется фосфорилированием.

Классический пример антитерминации - регуляция жизненного цикла бактериофага λ . Геном фага лямбда имеет три группы генов: немедленно ранние (предранние), задержанно ранние и поздние. Названия групп отражают последовательность "включения", то есть активации транскрипции, этих генов. Оба этапа активации зависят от действия белков-антитерминаторов pN и pQ . Давайте подробно рассмотрим действие первого из них.

На рисунке показана упрощенная схема ранней области фага λ . Два предранних гена, N и cro транскрибируются "влево" и "вправо" от промоторов P_L и P_R . В самом начале литического цикла развития бактериофага транскрипция останавливается непосредственно после генов N и cro на p -зависимых терминаторах t_{L1} и t_{R1} . Синтезирующийся в результате предранней транскрипции белок pN позволяет РНК-полимеразе преодолевать терминаторы t_{L1} и t_{R1} и считывать располагающиеся за ними задержанно ранние гены.

Действие фактора p . Терминация транскрипции при участии этого белка происходит, когда Rho , связанный с вновь образованным транскриптом, взаимодействует с РНК-полимеразой, остановившейся в области p -зависимого терминатора. ДНК в области таких терминаторов, как правило, не имеет особой структуры, богата основаниями С и бедна G, первичная последовательность различных терминаторов не имеет заметного сходства. Rho обладает РНК-зависимой АТФазной активностью и способствует отсоединению РНК-полимеразы через взаимодействие с белком NusG.

Действие белка pN высоко специфично в том плане, что он обеспечивает антитерминацию только на двух фаговых терминаторах, не влияя на терминацию транскрипции бактериальных генов. В то же время, если в фаговой ДНК точно в том же месте заменить фаговый терминатор любым p -зависимым бактериальным терминатором, антитерминация по-прежнему будет происходить. Следовательно, белок pN не опознает терминатор как таковой, и перед терминатором должен существовать какой-то сайт, узнаваемый этим белком. Такие участки называются *nutL* и *nutR* (от англ. *N utilisation*) для левого и правого терминатора соответственно. Эти участки располагаются на различных расстояниях от терминатора, в связи с чем возникает вопрос: "А как же они работают?". Когда pN узнает *nut* сайт, он должен подействовать на РНК-полимеразу таким образом, что она не сможет больше узнавать терминаторный сайт. Сравнение сайтов между собой показало, что они состоят из 17 н.п. палиндрома (который может образовать небольшую шпильку). Мутации в этом сайте, называемом также *boxB*, лишают pN способности предотвращать терминацию. Непосредственно перед этим сайтом располагается октамерная последовательность, называемая *boxA*, также участвующая в антитерминации.

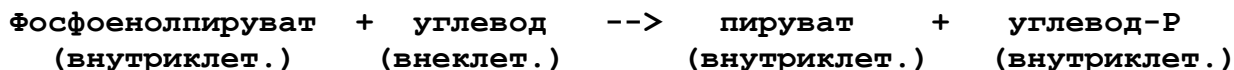
Белок pN действует, скорее всего, опознавая шпилечную структуру, формируемую *BoxB* областью, непосредственно после ее синтеза РНК-полимеразой, одновременно контактируя с субъединицами полимеразы. После такого узнавания антитерминатор остается в комплексе с РНК-полимеразой, фактически становясь ее субъединицей и обеспечивая изменение ее специфичности по отношению к терминаторам.

Поиск мутантов, предотвращающих действие рN, привел к обнаружению еще нескольких белков, являющихся компонентами транскрипционного аппарата, NusA и NusB (*N utilisation substance*). Белок NusA фактически является субъединицей РНК-полимеразы, снижающей скорость продвижения РНК-полимеразы, что облегчает терминацию, тогда как NusB как раз и является фактором, опознающим последовательность *boxA*. Связывание NusB с транскрипционным комплексом усиливает антитерминацию. Еще один белок, NusG, необходим для р-зависимой терминации, обеспечивая взаимодействие Rho и РНК-полимеразы.

2. Фосфотрансферазная система

Бактериальная фосфоенолпируват:углевод фосфотрансферазная система (фосфотрансферазная система, ФТС) - это сложная разветвленная сеть переноса фосфата белков, основной функцией которой является поглощение определенных углеводов из внешней среды. Набор углеводов, поступающих в клетку посредством ФТС, сильно варьирует у разных видов. Механизм работы ФТС заключается в транспорте углеводов через клеточную мембрану, сопряженном с фосфорилированием углевода. Наличие соответствующего углевода в среде и его транспорт внутрь клетки ведут к значительному расходу высокоэнергетического фосфата и, соответственно, снижает концентрацию фосфорилированных промежуточных переносчиков. А эти промежуточные переносчики фосфата взаимодействуют со многими клеточными белками и изменяют их активность. Таким образом наличие или отсутствие определенных углеводов в среде через ФТС влияет на целый ряд важнейших процессов, таких, например, как хемотаксис, индукция катаболических оперонов, метаболизм азота, компетентность и вирулентность. А поскольку некоторые бактерии, например, *Treponema pallidum*, имея все компоненты ФТС, не транспортируют сахара посредством ФТС, регуляторная функция ФТС не менее важна, чем транспортная.

Вне зависимости от организма и углевода ФТС катализирует следующий процесс:



Фосфорилирование углевода сопряжено с его транслокацией через мембрану, а необходимая для этого энергия обеспечивается промежуточным продуктом гликолиза - фосфоенолпируватом (ФЕП). Свободная энергия гидролиза фосфатной группы ФЕП - около -14.7 ккал/моль (больше, чем у АТФ), а для фосфорилированного сахара - около -3 ккал/моль. На первый взгляд, ФТС слишком расточительно расходует энергию. Однако, во-первых, в процессе гликолиза из молекулы ФЕП получается только одна молекула АТФ, а, во-вторых, ФТС обеспечивает одновременно и транспорт, и фосфорилирование своих субстратов (фосфорилирование необходимо для последующего катаболизма субстрата). Для углеводов, транспортируемых не-ФТС системами, на получение фосфорилированного субстрата внутри клетки расходуется более одной молекулы АТФ (как правило, одна на транспорт и одна на фосфорилирование). Это одна из причин, по которой ФТС системы существуют в основном у облигатно и факультативно анаэробных бактерий. Такие бактерии получают АТФ путем субстратного фосфорилирования в анаэробных условиях и, следовательно, должны очень экономно расходовать молекулы АТФ, достаемые им с таким трудом.

Белки ФТС традиционно разделяются на три группы - фермент I (EI), HPr (histidine protein) и фермент II (EII). EII обычно состоит из трех-четырех компонент (обозначаемых EIIA, EIIB, EIIC и EIID), которые могут быть либо субъединицами одного белка, либо отдельными белками. Фермент I и HPr - растворимые цитоплазматические белки размером соответственно 64-85 и 9-10 kDa, необходимые для фосфорилирования всех ФТС сахаров данной бактерии, в связи с чем их называют общими белками ФТС. С другой стороны, фермент II специфичен для каждого углевода, и либо является мембранным (если все компоненты его соединены в один белок), либо одна из разделенных субъединиц является мембранной. Перенос фосфата к сахару происходит от фосфоенолпирувата через EI, HPr, EIIA и EIIB.

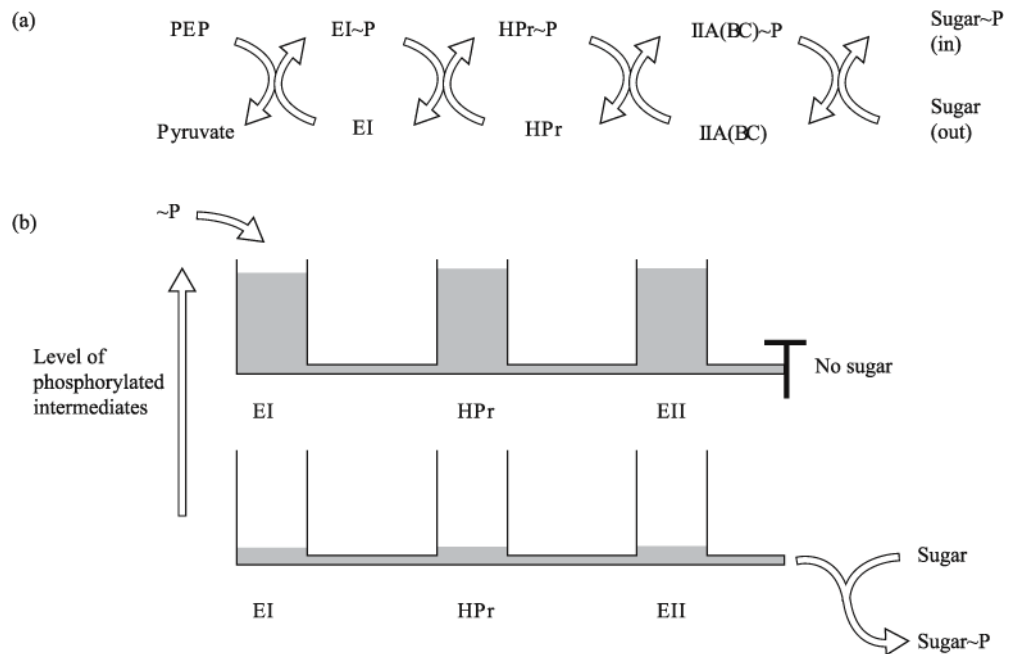


Рис.2.1. Принцип работы ФТС глюкозы

Более подробно этот процесс на примере ФТС глюкозы у *E. coli* выглядит следующим образом (Рис.2.1.(a)). Сначала EI

димеризуется и в таком состоянии автофосфорилируется, перенося фосфат с фосфоенолпирувата на His-189. Затем EI фосфорилирует HPr по остатку His-15. Затем P-HPr фосфорилирует один из сахар-специфических белков (или доменов) EIIA, опять же по гистидиновому остатку (His-90), откуда фосфат переносится на Cys-241 мембранного белка EIIBC, который уже передает фосфат на транспортируемую глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата. Как же происходит собственно транспорт углевода внутрь клетки? Предполагается, что процесс протекает следующим образом.

Периплазматический субстрат связывается с высокой аффинностью со своим специфическим EIIC. Домен или субъединица C фермента II является интегральным мембранным белком-переносчиком либо, по крайней мере, его субстрат-специфической частью. Этот переносчик (всегда в комплексе с EIIB) и осуществляет транспорт углевода внутрь клетки.

Если EIIB не фосфорилирован, субстрат может только очень медленно транслоцироваться через мембрану путем облегченной диффузии. Фосфорилирование IB по Cys остатку обеспечивает быструю транслокацию субстрата на цитоплазматическую сторону (происходит облегченная диффузия за счет конформационного изменения белка).

Затем происходит фосфорилирование связанного с переносчиком субстрата и его освобождение в цитоплазму.

Ряд экспериментов показывает, что транспорт сахара через мембрану не связан особенно тесно с фосфорилированием. Субстрат может отделяться от переносчика на внутренней стороне мембраны без фосфорилирования, более того, для некоторых Грам-положительных бактерий показана возможность работы переносчика в обратном направлении, то есть для выброса углевода из клетки. Иными словами, сам транспорт через мембрану является обратимым. Все стадии передачи фосфата с одного белкового переносчика на другой происходят практически без потери энергии и, следовательно, тоже являются обратимыми. Энергия высвобождается при передаче фосфата на транспортируемый сахар непосредственно после его проникновения в цитоплазму, что делает весь процесс необратимым и "запирает" сахар внутри клетки.

Пару слов о генетике ФТС. Гены, кодирующие общие компоненты ФТС, организованы в *pts* оперон, а специфичные для различных сахаров компоненты ФТС, как правило, расположены в оперонах с генами соответствующих катаболических ферментов, причем основной субстрат ФТС является индуктором всего оперона.

pts оперон состоит из трех генов, расположенных в следующем порядке: *ptsH* (кодирует HPr), *ptsI* (EI), *crr* (EIIA^{Glc}). Экспрессия оперона возрастает в три раза при росте на ФТС субстратах и требует присутствия комплекса БАК-цАМФ. Анаэробный рост также усиливает экспрессию оперона в соответствии с предположением о том, что ФТС - основной механизм транспорта углеводов в условиях анаэробноза. Оперон имеет как минимум три промотора - два (P0 и P1) расположены перед *ptsH*, а третий (P2) - перед *crr* (внутри *ptsI*). Перед промоторами P0 и P1 располагаются по сайту связывания БАК с высокой и низкой аффинностью соответственно. P0 является основным промотором в присутствии комплекса БАК-цАМФ, а P1 - в его отсутствии. С этих промоторов считывается один длинный транскрипт, захватывающий все три гена оперона, и один короткий, перекрывающий только *ptsH*. Еще один короткий транскрипт считывается с P2 и является основным для гена *crr*. Такая организация транскрипции оперона обеспечивает большее количество молекул EIIA^{Glc} по сравнению с HPr и EI. Транскрипция *pts* оперона стимулируется нефосфорилированным EIIСВ^{Glc} (с P0 промотора). Таким образом, стимуляция транскрипции *pts* оперона комплексом БАК-цАМФ и EIIСВ^{Glc} (?) действует в двух противоположных ситуациях - в отсутствии глюкозы в среде и в ее присутствии, результатом чего является поддержание экспрессии ФТС оперона на сходном уровне в условиях как сильной, так и слабой катаболитной репрессии.

Мутанты, дефектные по EI или HPr, не способны утилизировать ФТС сахара как источники углерода. К таким сахарам у *Enterobacteriaceae* относятся глюкоза, фруктоза, манноза, гекситолы, β-глюкозиды, N-ацетилглюкозамин, сорбоза, сахароза, трегалоза и целлобиоза. Как ни странно, такие мутанты (по общим компонентам ФТС) также не растут и на ряде не-ФТС сахаров, к каковым относятся лактоза, мальтоза, мелибиоза, глицерин, рамноза, ксилоза и интермедиаты цикла Кребса. Почему это происходит?

Простейшая модель, объясняющая фенотип ФТС мутантов по отношению к утилизации не-ФТС сахаров, заключается в следующем. Фермент ПA^{Glc} может существовать в двух формах - фосфорилированной и нефосфорилированной. Степень фосфорилирования ПA^{Glc} определяется балансом между фосфорилированием его P-HPr и дефосфорилированием через ПСВ^{Glc} в присутствии его субстрата - глюкозы. ПA^{Glc} и P-ПA^{Glc} взаимодействуют с и регулируют различные белки. ПАGlc связывается с и ингибирует ряд ферментов, существенных для метаболизма углеводов, например, переносчики лактозы и мелибиозы, глицерол киназу. Прямым результатом такого взаимодействия является ингибирование транспорта и последующего метаболизма этих источников углерода. Такое явление называется исключением индуктора. Кроме того, фосфорилированный ПA^{Glc} участвует в активации аденилатциклазы. А поскольку цАМФ необходим для экспрессии многих катаболитных генов, регуляция уровня позволяет контролировать синтез ферментов. Но если регуляторной функцией обладает всего один компонент ФТС глюкозы, ПA^{Glc}, как другие ФТС сахара оказывают ингибирующее влияние на утилизацию не-ФТС субстратов?

В клетке, растущей на не-ФТС субстрате общие ФТС белки (EI и HPr) будут находиться преимущественно в фосфорилированном состоянии, поскольку они не смогут "сбросить" фосфат на транспортируемый сахар (Рис.2.1.(b)). Добавление ФТС субстрата приведет к "разгрузке" фосфата с общих компонентов ФТС, а поскольку реакция фосфорилирования ПАGlc белком HPr обратима, это обеспечит дефосфорилирование ПАGlc. В таких условиях поступление в клетку не-ФТС субстратов будет ингибироваться из-за исключения индуктора нефосфорилированным ПАGlc, а экспрессия катаболитных генов будет минимальной из-за низкой концентрации цАМФ, возникающей из-за отсутствия стимулирования аденилатциклазы P-ПАGlc.

Как белок EIIA^{Glc} осуществляет свою регуляторную функцию? В зависимости от механизма действия EIIA^{Glc} не-ФТС сахара делятся на две группы. К первой относятся лактоза, мелибиоза, мальтоза и глицерол, ко второй - ксилоза, рамноза, галактоза и интермедиаты цикла Кребса. Для сахаров первой группы EIIA^{Glc} ингибирует и транспорт, и катаболизм. Транспорт ингибируется путем непосредственного связывания нефосфорилированного EIIA^{Glc} с мембранным транспортером соответствующего углевода, причем только тогда, когда транспортер уже связал свой сахар. Как происходит активация аденилатциклазы - неизвестно, но сниженный уровень цАМФ в отсутствие P-EIIA^{Glc} определяет фактически полное отсутствие экспрессии генов катаболизма не-ФТС сахаров второй группы (Рис.2.2.).

Катаболитная репрессия

Таким образом, мы снова возвращаемся к явлению катаболитной репрессии, и теперь у вас должно быть четкое представление о том, чем объясняется классический феномен диауксии при росте *E. coli* на лактозе и глюкозе.

Однако, при общем сходстве ФТС систем у разных организмов механизмы катаболитной репрессии несколько различаются. Рассмотрим роль компонентов ФТС в этом явлении у группы Грам-положительных бактерий с низким ГЦ содержанием на примере *B. subtilis* (Рис. 2.3.). Центральной молекулой, отвечающей за катаболитную реPRESSION у этой бактерии является HPr. В отличие от энтеробактерий, HPr у *B. subtilis* может быть фосфорилирован в двух положениях - His-15 ФТС ферментом I и Ser-46 активируемой метаболитами (прежде всего, фруктозо-бис-фосфатом) АТФ-зависимой HPr-киназой (продуктом гена *ptsK*). Фосфорилирование по Ser-46 служит исключительно регуляторным целям. Катаболитная репрессия у этих бактерий идет двумя путями: во-первых, через реPRESSION катаболитных генов и оперонов белком CspA (catabolite control protein) и, во-вторых, за счет отсутствия индукции катаболитных генов и оперонов, что определяется HPr путем фосфорилирования соответствующих ферментов.

CspA ингибирует транскрипцию катаболитных генов, связываясь с операторным сайтом, который в данном случае называется *cre* (catabolite responsive element). CspA принадлежит к классу LacI-подобных регуляторов транскрипции. Операторные сайты *sce* располагаются в регуляторных областях многих оперонов, таких как *xyl*, *gut* (утилизация глюконата), *hut* (утилизация гистидина), *lev* (транспорт фруктозы и деградация левана) и др. Для связывания CspA с оператором *sce* необходимо действие корепрессора, которым в данном случае является фосфорилированный по Ser-46 HPr. Активная форма репрессора состоит из димера CspA и двух молекул HPr-S46-P.

Второй механизм катаболитной реPRESSION у Грам-положительных бактерий определяется действием специфических для каждого сахара регуляторов. Примерами таких регуляторов являются LevR, LicT и LacT, контролирующие синтез соответственно леваназы, β -глюкозидазы и β -галактозидазы. Такие регуляторы действуют как активаторы транскрипции или антитерминаторы (подобно BglG у *E. coli*), а общим между ними является наличие регулируемого ФТС домена (PRD). Активность этих регуляторов контролируется фосфорилированием белком HPr или EII. В отсутствие глюкозы HPr-H15-P фосфорилирует один из аминокислотных остатков PRD домена, что стимулирует активацию транскрипции. Фосфорилирование HPr по Ser-46 HPr-киназой предотвращает фосфорилирование регуляторов. Таким образом создается связь между гликолитической активностью (которую детектирует HPr-киназа), степенью фосфорилирования HPr и активностью регуляторов, содержащих PRD домен.

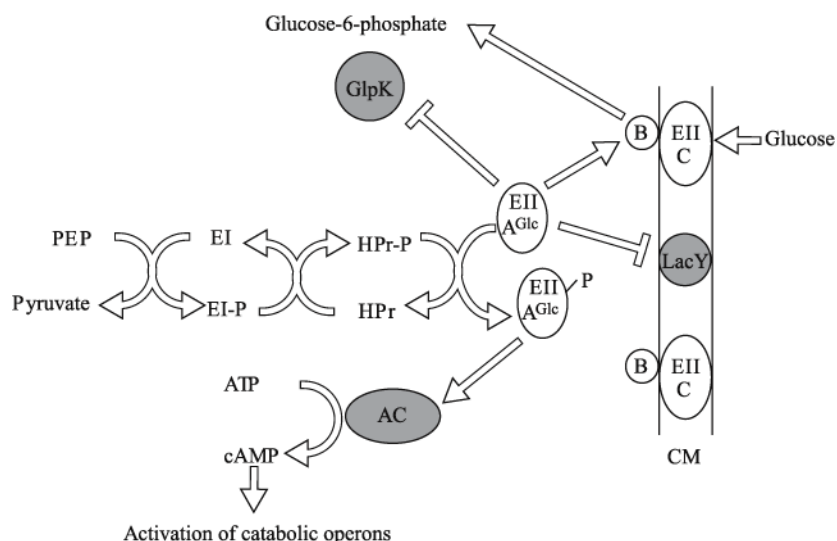


Рис.2.2. Катаболитная реPRESSION у *Escherichia coli*

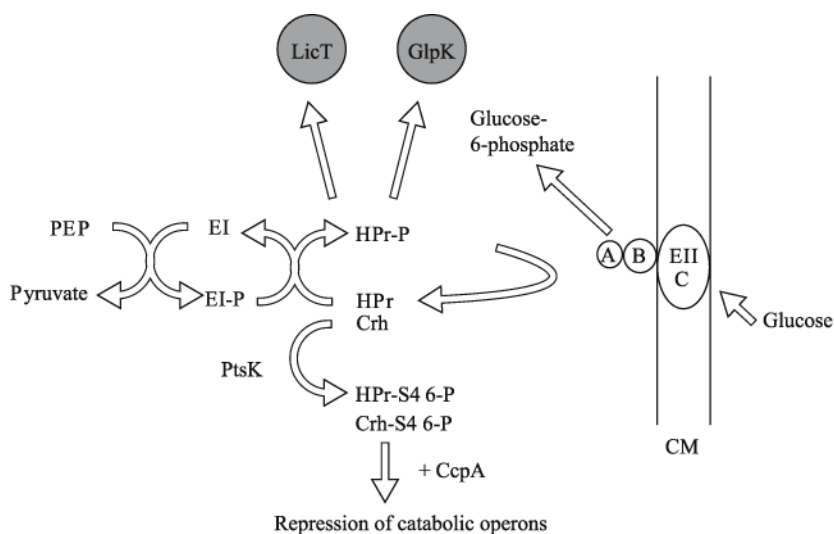


Рис.2.3. Катаболитная реPRESSION у *Bacillus subtilis*

bgl оперон – ФТС и антитерминация.

bgl оперон *E. coli* (криптический) состоит из трех генов: *bglG*, кодирующего позитивный регулятор (антитерминатор), *bglF*, кодирующего ФТС транспортер β -глюкозидов и *bglB*, кодирующий фермент, гидролизующий β -глюкозиды. Контроль экспрессии оперона осуществляется при помощи двух терминаторов – в лидерной области и между *bglG* и *bglF*. BglF фосфорилируется ФТС белками и в присутствии β -глюкозидов сбрасывает фосфатную группу на эти сахара в процессе их транспорта. BglF также может выступать в роли киназы, перенося свой фосфат на BglG, и в роли фосфатазы, дефосфорилируя BglG.

Терминаторные области *bgl* оперона содержат по два перекрывающихся участка, способных образовывать альтернативные шпильчатые структуры. Связывание BglG с первой шпилькой препятствует образованию второй, являющейся терминатором. BglG активно связывается с РНК (и выполняет антитерминаторную функцию) только в форме димера. Фосфорилирование BglG переводит его в мономерную форму и препятствует связыванию с РНК. В присутствии β -глюкозидов BglF фосфорилирует их и дефосфорилирует BglG; при отсутствии субстрата BglF фосфорилирует BglG, что блокирует антитерминацию. Этот пример показывает эффективное использование фосфорилирующей способности транспортного белка для детекции сигнала из внешней среды и трансформации его в изменение экспрессии генов через белковые взаимодействия.

sac genes of *B. subtilis*

3. Альтернативные сигма-факторы РНК-полимеразы

Узнавание промотора у бактерий требует ассоциации кор-фермента РНК-полимеразы ($\beta\beta'\alpha_2$) с а) сигма (σ) субъединицей, что дает активный холофермент (Рис. 3.1). Все свободноживущие бактерии содержат множественные сигма-факторы (у некоторых бактерий описано до 10-20). К числу таковых относятся основной сигма-фактор, контролирующий гомеостатические функции, и альтернативные сигма-факторы, активируемые специфическими сигналами или стрессовыми условиями (Табл. 3.1). Как правило, только один σ -фактор обеспечивает транскрипцию всех жизненно важных генов, обеспечивающих гомеостатические клеточные процессы (репликацию ДНК, транскрипцию, трансляцию и т.д.). Этот сигма-фактор называют основным, а все остальные – альтернативными. Инактивация основного σ -фактора летальна, альтернативных, как правило, – нет. Названия сигма-факторов соответствуют их молекулярной массе (например σ^{38}). Все гены, кодирующие σ -факторы, имеют аббревиатуру *rho* (RNA polymerase), поэтому для обозначения сигма-факторов также пользуются четырехбуквенными именами (например RpoS).

Основной σ -фактор *E. coli* имеет молекулярную массу около 70 kDa и обозначается σ^{70} или RpoD. Альтернативный σ -фактор, контролирующий большинство генов азотного метаболизма, имеет размер 54 kDa, и соответственно обозначается σ^{54} или RpoN. Эти два белка не похожи друг на друга ни по первичной последовательности, ни по структуре, и

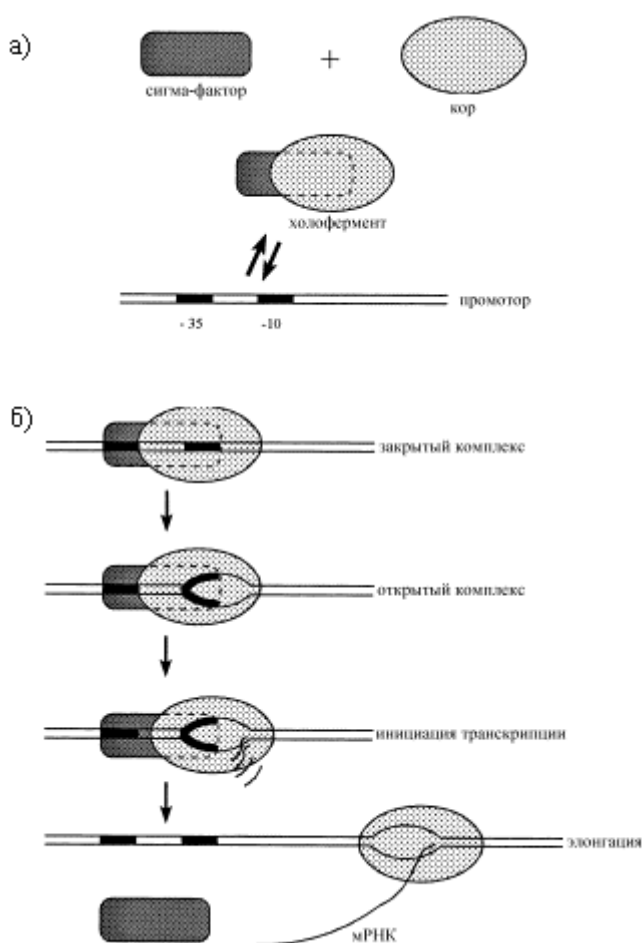


Рис.3.1. Инициация транскрипции у прокариот

являются прототипами двух больших семейств σ -факторов. Все основные и большинство альтернативных σ -факторов принадлежат к семейству σ^{70} . Альтернативные σ -факторы этого семейства, в свою очередь, могут быть сгруппированы в три подсемейства, контролирующих споруляцию, подвижность и разнообразные внецитоплазматические функции (синтез секретируемых белков, транспорт железа, реакция на различные стрессовые воздействия). Представители семейства σ^{54} также присутствуют у многих бактерий и контролируют азотный метаболизм, синтез ряда гидролаз и жгутиковых белков.

Таблица 3.1. Сигма-факторы *Escherichia coli*

Сигма-фактор	Размер белка, АК	Контролируемые процессы	Количество подконтрольных генов
RpoD	613	большинство жизненно важных генов	~1000
RpoS	330	общий стресс и стационарная фаза	~100
RpoH	284	тепловой шок	~40
RpoF	239	жгутиковый аппарат и хемотаксис	~
RpoE	202	внецитоплазматические гены и экстремальный тепловой шок	~5
FecI	173	транспорт цитрата железа и внецитоплазматические гены	~5
RpoN	477	азотный метаболизм	~15

Основной σ -фактор *E. coli* имеет молекулярную массу около 70 kDa и обозначается σ^{70} или RpoD. Альтернативный σ -фактор, контролирующий большинство генов азотного метаболизма, имеет размер 54 kDa, и соответственно обозначается σ^{54} или RpoN. Эти два белка не похожи друг на друга ни по первичной последовательности, ни по структуре, и являются прототипами двух больших семейств σ -факторов (Рис. 3.2). Все основные и большинство альтернативных σ -факторов принадлежат к семейству σ^{70} . Альтернативные σ -факторы этого семейства, в свою очередь, могут быть сгруппированы в три подсемейства, контролирующих споруляцию, подвижность и разнообразные внецитоплазматические функции (синтез секретируемых белков, транспорт железа, реакция на различные стрессовые воздействия). Представители семейства σ^{54} также присутствуют у многих бактерий и контролируют азотный метаболизм, синтез ряда гидролаз и жгутиковых белков.

Последовательности промоторов, опознаваемых альтернативными сигма-факторами, существенно различаются и, как правило, не могут быть распознаны более чем одной сигма-субъединицей. Исключение – RpoD и RpoS

(схема - промоторы)

Будучи глобальными регуляторами, сигма факторы, как правило, не детектируют изменение условий сами, а полагаются в этом на другие белки. Сигма-факторы обычно

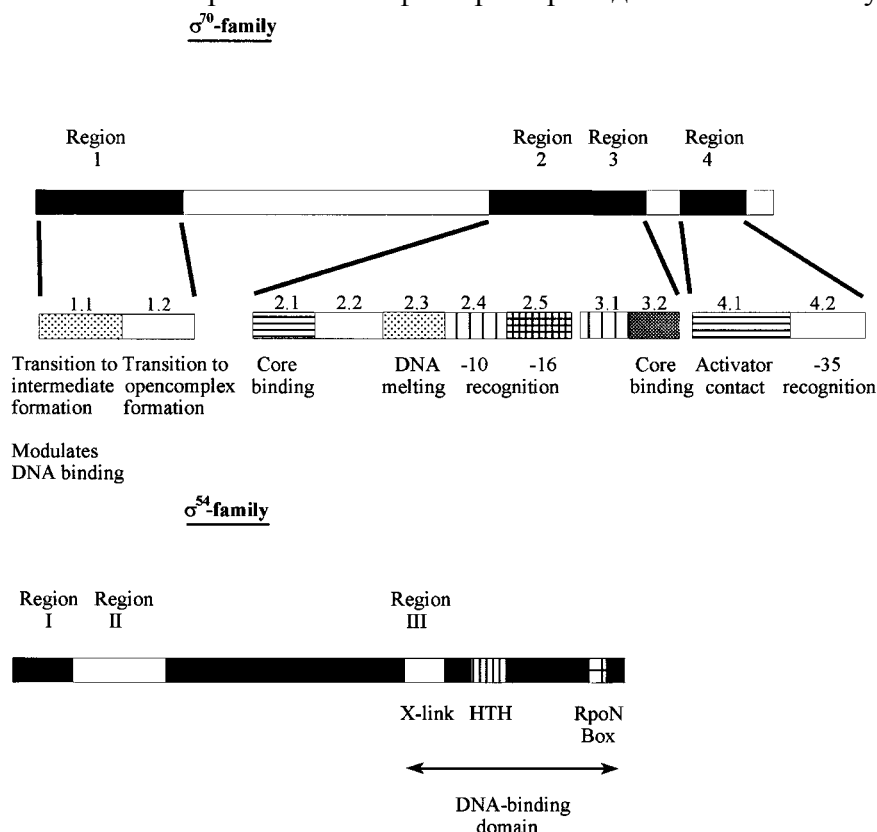


Рис.3.2. Структурно-функциональная организация сигма-факторов.

являются конечным либо (реже) промежуточным звеном какого-либо регуляторного каскада. Именно поэтому сигма-факторы обычно сами подвержены регуляции, причем осуществляться она может на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях.

σ-факторы бактериофагов. Каскадная регуляция экспрессии генов.

Однако исторически одними из первых были открыты альтернативные сигма-факторы, участвующие в каскадной активации генов при литическом цикле развития некоторых бактериофагов. Классический пример - бактериофаг SPO1 *B. subtilis*. Литический цикл бактериофага можно разделить на три стадии. Сразу после инфекции транскрибируются ранние гены бактериофага. Они считываются с типичных бактериальных промоторов бактериальным холоферментом с основной сигма-субъединицей (σ^{55} у *B. subtilis*). Очередность транскрипции средних и поздних генов определяется тремя фаговыми генами, 28, 33 и 34. Продукт гена 28, обозначаемый gr28, является сигма-фактором. Замещая основной сигма-фактор, он позволяет РНК-полимеразе считывать средние гены бактериофага. Продукты средних генов 33 и 34, gr33 и gr34, замещают gr28, снова изменяя промоторную специфичность РНК-полимеразы, которая становится способной считывать теперь уже только промоторы поздних фаговых генов. Таким образом, альтернативные сигма-факторы позволяют бактериофагу полностью переключить транскрипционный аппарат хозяйской клетки на считывание своих собственных генов.

rpoS

У *E. coli* важнейшим сигма-фактором является σ^S , продукт гена *rpoS*. Этот сигма-фактор наиболее близок по своей аминокислотной последовательности к основной сигме 70. Промоторы этих сигма-факторов тоже очень похожи, но, несмотря на это, специфичны каждый для своего сигма-фактора *in vivo*. Буква S в названии σ^S происходит от стационарной фазы роста, на протяжении которой этот фактор был впервые обнаружен. Затем присутствие этого сигма-фактора было обнаружено в других стрессовых условиях, и сейчас считается, что присутствие σ^S является свидетельством т.н. «общего стрессового ответа». Этот ответ наблюдается, когда клетка сталкивается с рядом стрессовых ситуаций, видимым признаком чего является снижение скорости роста вплоть до вхождения в стационарную фазу. Голодание, повышение осмолярности среды или понижение pH, неоптимальная температура – эти и другие стрессовые воздействия могут индуцировать общий стрессовый ответ. Физиологические последствия общего стрессового ответа включают устойчивость к многим стрессовым воздействиям, накопление запасных питательных веществ, изменения структуры клеточной стенки (увеличение частоты кросс-сшивок в пептидогликане) и изменение морфологии клетки (уменьшение общего размера и укорачивание клеток – они становятся почти сферическими).

Во время логарифмической фазы роста в лабораторных условиях клетки *E. coli* практически не содержат σ^S , и потому мутанты по *rpoS* не имеют видимых дефектов. В этих условиях большинство молекул РНК-полимеразы экспрессируют гомеостатические гены и имеют в своем составе главный сигма-фактор σ^{70} (продукт гена *rpoD*). Эта ситуация меняется, как только клетки подвергаются какому-либо стрессу, то есть попадают в условия, не оптимальные для роста. В этих условиях σ^S индуцируется до уровня 30% от количества σ^{70} , что приводит к появлению достаточного количества РНК полимеразы в комплексе с σ^S и индукции большого числа (не менее 100) σ^S -зависимых промоторов. Активируемые гены жизненно необходимы для выживания в стрессовых условиях, например, в стационарной фазе.

При адаптации к стрессовой ситуации σ^S действует как быстро индуцируемый координатор стрессового ответа, а также как основной регулятор долговременной адаптации со сложными физиологическими последствиями. Первая функция σ^S очевидна при быстрой, но краткосрочной индукции σ^S при переходе клетки с утилизации глюкозы на лактозу. Как вы помните, при выращивании бактерии на смеси двух углеводов наблюдается феномен диауксии – фаза логарифмического роста, во время которой бактерии используют предпочтительный углевод, затем плато, когда происходит перестройка метаболизма и второй этап логарифмического роста. Прежде чем клетка начнет утилизацию лактозы, ФТС глюкозы должна полностью освободиться от субстрата, должен накопиться цАМФ, что и приведет к индукции *lac*-оперона. Как раз накопление цАМФ и зависит от σ^S – кратковременное появление этого σ-фактора и активация σ^S -зависимых генов предшествуют накоплению цАМФ и необходимы для этого.

Количество активной σ^S субъединицы контролируется на уровне транскрипции, трансляции и путем протеолиза. Различные стрессовые условия по-разному влияют на эти уровни регуляции. Даже в

условиях быстрого роста, когда белок σ^S не детектируется, присутствует достаточно много мРНК *rpoS*. Формирование вторичной структуры этой мРНК препятствует ее трансляции. Для активации трансляции этой мРНК необходимо действие небольшого РНК-связывающего белка Hfq (HF-I). Кроме того, транскрипция *rpoS* в стрессовых условиях также возрастает.

Такой механизм регуляции уровня σ^S используется в тех стрессовых условиях, которые требуют длительной адаптации. В тех же случаях, когда требуется быстрое реагирование на внезапные изменения условий, такие как внезапное голодание, сдвиг pH, повышение температуры и осмолярности среды, увеличение к-ва σ^S происходит за счет предотвращения ее протеолиза. Протеолиз σ^S происходит за счет протеазы ClpXP при помощи регуляторного белка RssB. Нестабильность σ^S определяется короткой последовательностью аминокислотных остатков, которая отсутствует у σ^{70} . RssB узнает эту последовательность и выступает в роли субстрат-узнающего фактора для ClpXP протеазы. Сродство RssB к σ^S изменяется в зависимости от его фосфорилирования/дефосфорилирования, которое каким-то образом связано со стрессовыми условиями.

Каковы же гены-мишени, активируемые σ^S ? Их более сотни, и все они в той или иной степени выполняют функцию адаптации к стрессовым условиям. В качестве примеров можно привести активацию генов клеточного деления *ftsQAZ* и активацию системы защиты от активного кислорода. В последнюю входят каталазы KatE, KatG и протекторный белок Dps, непосредственно защищающий ДНК от перекиси водорода.

В клетках, находящихся в стрессовых условиях, две формы РНК полимеразы, $E\sigma^S$ и $E\sigma^{70}$, сосуществуют и обеспечивают экспрессию различных генов. Тем не менее, промоторные последовательности генов, контролируемых $E\sigma^S$, очень сходны с таковыми зависящих от $E\sigma^{70}$ – вплоть до того, что в экспериментах *in vitro* оба холофермента достаточно хорошо транскрибируют оба типа промоторов. (Хотя $E\sigma^S$ все же менее требователен к -35 последовательности)

Как же тогда обеспечивается специфичность σ^S -зависимых промоторов? Экспрессия многих генов регулона модулируется глобальными регуляторами H-NS, Lrp, cAMP-CRP, IHF и Fis. Часть из этих факторов является распространенными гистонотипными белками с не очень ясными функциями. Зачастую несколько белковых факторов одновременно контролируют транскрипцию с σ^S -зависимых промоторов. Также часто встречается ситуация, когда один и тот же ген транскрибируется с двух промоторов, зависящих от разных факторов. В таких случаях транскрипция с σ^S -зависимого промотора зачастую зависит от дополнительного белкового регулятора, тогда как транскрипция с σ^{70} промотора конститутивна.

rpoE

Итак, мы разобрали функции и принцип активации σ^S , сигма-фактора, наиболее близкого к основному сигма-фактору σ^{70} . Другие сигма-факторы менее сходны с σ^{70} по своей последовательности и опознают промоторы, не имеющие ничего общего со "стандартным" промотором σ^{70} .

(Таблица с последовательностями промоторов для разных сигм)

Рассмотрим принцип действия другого сигма-фактора *E. coli*, σ^E . Этот белок принадлежит к большому семейству ECF (*extracytoplasmic factors*) сигма-факторов. Свое название эти сигма-факторы получили в связи с их участием в регуляции экспрессии внецитоплазматических белков (периплазматических, внешней мембраны и секретируемых во внешнюю среду). Основная функция σ^E - обеспечивать синтез белков, ответственных за нормальный фолдинг (сворачивание) белков внешней мембраны, но, кроме того, σ^E усиливает транскрипцию генов теплового шока (путем активации еще одного сигма-фактора, σ^{32}), а у патогенных бактерий родственные сигма-факторы активируют гены вирулентности.

σ^E реагирует на белки внешней мембраны и периплазматические белки, утратившие нормальную конформацию. Но поскольку сигма-фактор, естественно, является цитоплазматическим, а сигнал для его активации находится в периплазме, должен быть какой-то переносчик сигнала между двумя клеточными компартментами. Эту функцию выполняет мембранный белок RseA. В отсутствие сигнала σ^E инактивирован путем связывания с RseA. Эта инактивация усиливается за счет взаимодействия RseA с периплазматическим белком RseB. При нарушениях внешней мембраны, предотвращающих нормальный фолдинг ее белков, RseB связывается с неправильно свернутыми белками, освобождая RseA. Это ведет к ослабеванию связи RseA с σ^E , а дополнительное взаимодействие неправильно

свернутых белков с RseA окончательно освобождает σ^E , который связывается с РНК-полимеразой и активирует транскрипцию ряда генов (Рис. 3.3). В число этих генов входят:

fkpA, кодирующий периплазматический шаперон (необходимый для нормального фолдинга периплазматических белков и белков внешней мембраны);

degP - периплазматическая протеаза, деградирующая ненормальные или неправильно свернутые белки;

rpoH - сигма-фактор, активирующий транскрипцию генов теплового шока;

собственный оперон *rpoE rseABC*;

гены вирулентности у ряда бактерий.

Поскольку σ^E активирует транскрипцию своего собственного оперона, первоначальная индукция по механизму положительной обратной связи резко усиливается за счет дополнительного синтеза σ^E . А поскольку одновременно с σ^E происходит сверхпродукция негативных регуляторов RseA и RseB, вся система быстро выключается, как только периплазма оказывается очищенной от неправильно свернутых белков.

У ряда бактерий система σ^E была адаптирована для контроля генов вирулентности. Так, у *P. aeruginosa* гомолог σ^E (AlgU) регулирует экспрессию генов *alg*, кодирующих синтез мукоидной капсулы, необходимой для установления хронических инфекций. Так же, как и у *E. coli*, до поступления сигнала сигма-фактор инактивирован взаимодействием с другим белком, MucA. Сигнал для активации AlgU скорее всего продуцируется на начальных этапах инфекции, например, в виде повышенной температуры, мешающей нормальному фолдингу белков оболочки.

Белки RseA и MucA принадлежат к классу регуляторов, известных как анти-сигма факторы. Принцип работы этих белков прост - связываясь с сигма-факторами, они препятствуют их взаимодействию с РНК-полимеразой. Кроме σ^E регулона, анти-сигма факторы участвуют в контроле регулонов, активируемых σ^{28} (биосинтез жгутиков) и σ^F (ранние стадии споруляции *B. subtilis*).

Наиболее интересный пример действия анти-сигма факторов представляет регуляция процесса биогенеза жгутиков, хорошо изученная у *Salmonella typhimutium*. Синтез поздних жгутиковых генов (кодирующих флагеллин и хемотаксические функции) зависит от альтернативного сигма фактора σ^{28} . Во время ранних стадий синтеза жгутиков σ^{28} находится в инактивированном состоянии за счет взаимодействия с анти-сигма фактором FlgM. Как только базальное тело и крюк оказываются собранными, FlgM секретируется через жгутик, высвобождая активный σ^{28} . Высвобождение σ^{28} приводит к началу транскрипции поздних жгутиковых генов, одним из продуктов которых является флагеллин - белок, из субъединиц которого собрана нить жгутика. А поскольку субъединицы флагеллина экспортируются через тот же канал, что и FlgM, создается препятствие для выхода FlgM из клетки, из-за чего его уровень внутри клетки снова возрастает.

Литература:

1. D. Missiakas and S. Raina. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. Mol Microbiol 1998 28(6):1059-1066

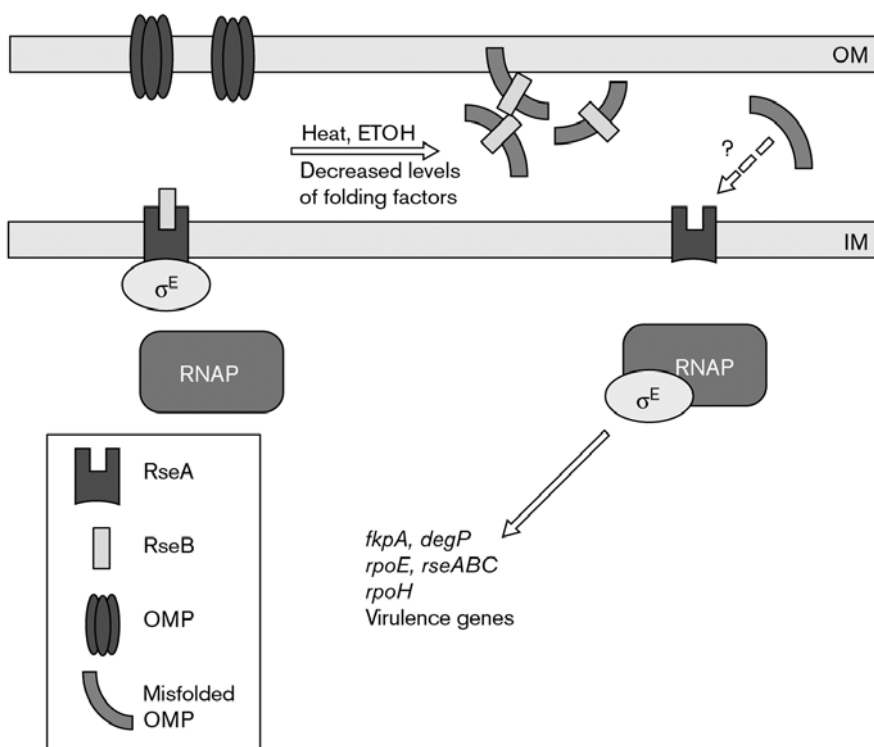


Рис.3.3. Контроль регулона RpoE.

4. Тепловой шок, фолдинг и деградация белков

Тепловой шок является гомеостатическим ответом клетки на индуцированное стрессовыми условиями изменение конформации белков. Этот феномен свойственен всем организмам, и его молекулярный механизм практически идентичен у бактерий, архей и эукариот (но детали рассматривать мы будем все-таки у *E. coli*). При повышении температуры клетка начинает синтезировать т.н. белки теплового шока, к которым прежде всего относятся молекулярные шапероны (DnaK, GroEL) и АТФ-зависимые протеазы (Lon, ClpAP). Эти белки выполняют две основные функции - обеспечивают фолдинг (сворачивание в нативную конформацию) и деградацию поврежденных белков. Несмотря на полную противоположность этих двух функций результат их осуществления один - ликвидация поврежденных (и потенциально опасных для клетки) белков. Цитоплазматические протеазы по своей структуре напоминают шапероны - древние машины для фолдинга. И те, и другие распознают экспонированные гидрофобные участки неправильно свернутых или денатурированных белков.

Молекулярные шапероны

Шапероны-шаперонины: разница

Эти белки обеспечивают правильный фолдинг синтезируемых белков за счет энергии гидролиза АТФ. Они особенно важны у прокариот, где фолдинг обычно не является котрансляционным. Шапероны могут также вернуть в нормальную конформацию многие денатурированные белки (накапливающиеся при многих стрессах, включая тепловой шок), а также предотвращают агрегацию олигомеров и обеспечивают их разделение. Наконец, шапероны участвуют в секреции, поддерживая секретируемые белки в развернутом состоянии. Шапероны из семейств Hsp70 и Hsp60 (аббревиатура из слов heat shock protein + мол. масса) присутствуют в цитоплазме в наибольших количествах. Гомологом Hsp60 у *E. coli* является GroEL, формирующий гигантский комплекс с GroES, в центральной полости которого целиком может поместиться белок размером до 55 кДа (Рис. 4.1.).

GroES-GroEL комплекс имеет существенное сходство с эукариотической 26S

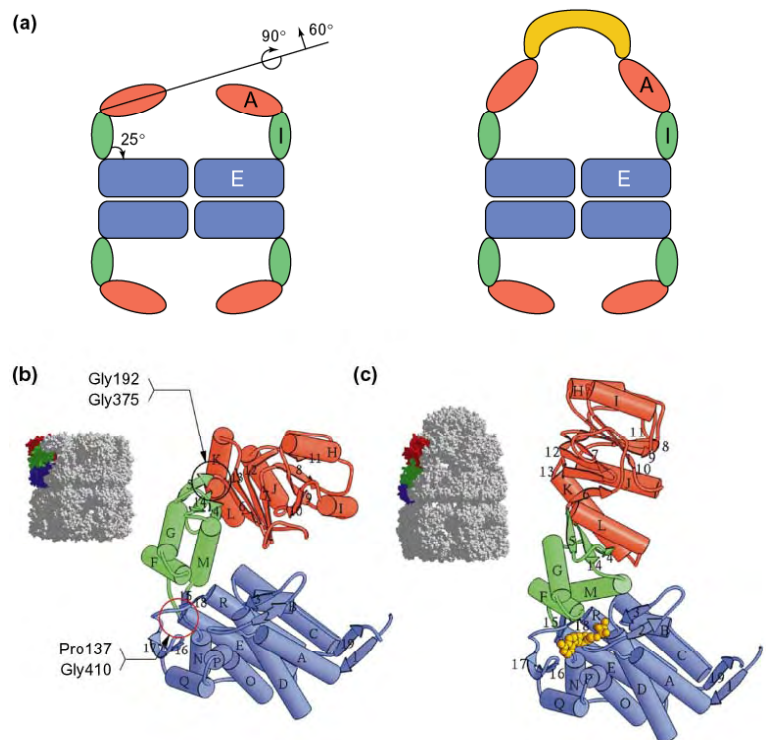


Рис. 4.1. Шаперонин GroELS

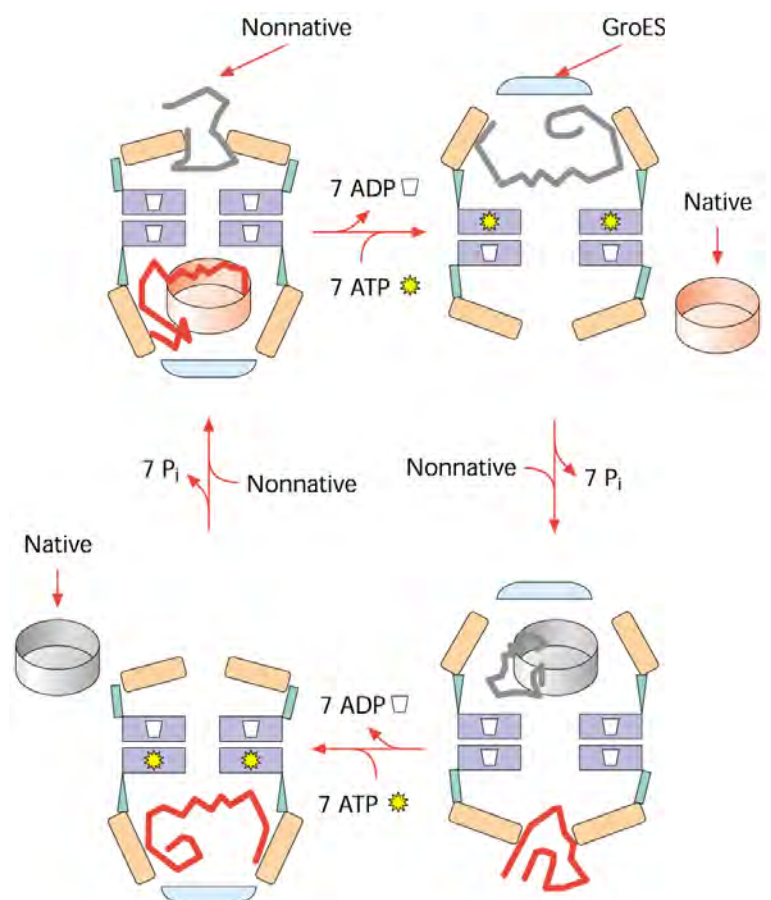


Рис. 4.2. Рабочий цикл шаперонина GroE

протеосомой, ответственной за деградацию меченых убихитином белков.

У *E. coli* гомологом Hsp70 является DnaK, который образует комплекс с кошапероном DnaJ и белком GrpE (Рис. 4.3).

E. coli также имеет дополнительные шапероны, такие как SecB, ClpB и IbpAB, взаимодействующие с белками, являющимися плохими субстратами для шаперонов Hsp70 и Hsp60 семейств.

Почему белкам нужна помощь при фолдинге?

При фолдинге белки проходят через ряд промежуточных конформаций, имеющих более высокую энергию, чем конечная конформация (Рис. 4.4). Поэтому для многих белков существуют локальные энергетические минимумы, в которых частично свернутый белок может задержаться надолго (Рис. 4.5). Белки, требующие помощи в фолдинге, опознаются аппаратом DnaK-DnaJ-GrpE, предположительно через находящиеся в контакте с раствором гидрофобные участки. Молекулярный шаперон затем, гидролизуя АТФ, "перетасовывает" конформацию многих оснований, фактически разворачивая белок и позволяя ему свернуться заново. Если нативная конформация не достигается таким путем, белок переходит в ведение шаперонина GroES-GroEL. Полость шаперонина экранирует белок от контакта с раствором и другими субъединицами, предотвращая агрегацию и позволяя белку спокойно свернуться.

Специфичность шаперонов.

III. взаимодействуют предпочтительно с гидрофобными АК, хотя SecB предпочитает положительно заряженные. Неправильно свернутые или денатурированные белки опознаются по гидрофобным участкам, в норме экранированным от контакта с раствором либо внутри молекулы, либо путем контакта с гидрофобной областью другого белка или с мембраной. Недавно было показано, что DnaK опознает гидрофобный участок из 4-5 оснований, одним из которых является лейцин; такой участок должен быть фланкирован основными АК. Такие участки встречаются в среднем через каждые 36 АК, обычно в экранированных участках молекулы.

Шапероны и протеолиз.

Роль шаперонов в протеолизе была продемонстрирована при изучении мутантов GroES-GroEL и DnaK - оказалось, что некоторые из них стабилизируют аномальные белки. Затем было обнаружено, что ряд цитоплазматических протеаз - ClpAP, ClpXP, HslVU - имеют одну субъединицу с активным сайтом для протеолиза, а вторую - с АТФ-зависимой шаперонной активностью. Кроме того, другие цитоплазматические протеазы, напр. HflB (FtsH), хоть и состоящие из одной полипептидной цепи, проявляют шаперонную активность в определенных условиях. Это свидетельствует о том, что АТФ-зависимость цитоплазматических протеаз может отражать шаперонную активность, денатурирующую субстрат, что делает его доступным для протеазы. (В принципе никакой энергии для самого протеолиза не нужно, т.к. расщепление пептидной связи - экзотермическая реакция.) Другая возможная функция АТФ - индукция конформационных изменений, ведущих к мультимеризации некоторых протеаз. Например, в отсутствие гидролиза АТФ протеаза ClpAP не может сформировать своей нормальной цилиндрической структуры, без чего ее взаимодействие с субстратами невозможно.

Широкая субстратная специфичность шаперонов и, предположительно, протеаз отражает их способность узнавать в норме спрятанные гидрофобные области плохо свернутых или денатурированных белков. Такая общность узнавания создает дилемму: взаимодействие с шаперонами

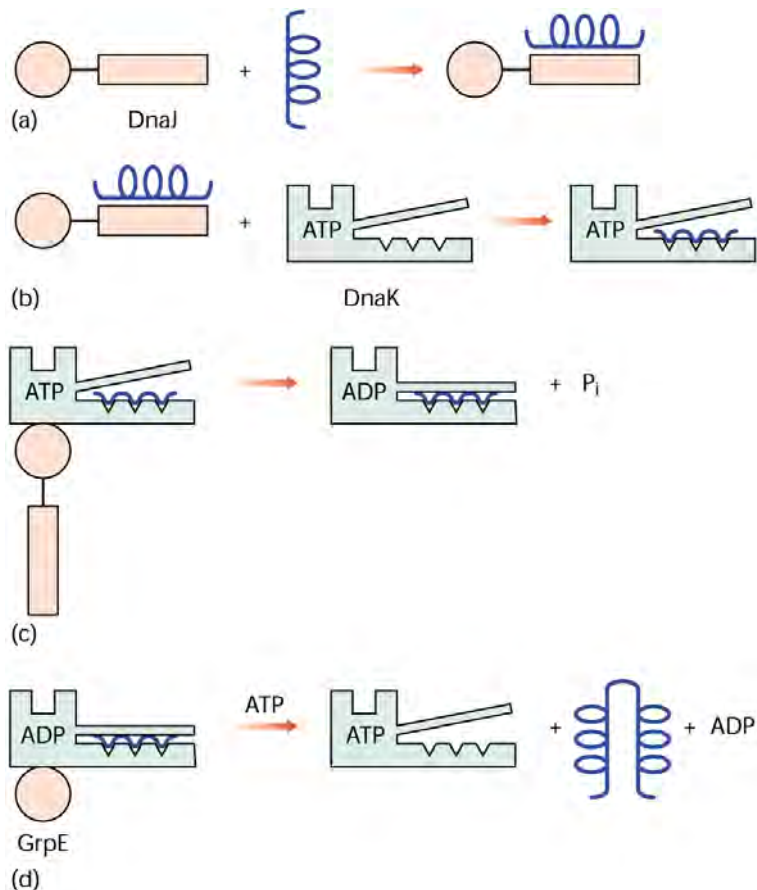


Рис. 4.3. Рабочий цикл шаперона DnaK

ведет к ренатурации или фолдингу, а взаимодействие с протеазами ведет к деструкции. Следовательно, клетка каким-то образом должна решить, по какому пути направить каждый поврежденный белок.

Сигналы для протеолиза обычно располагаются на карбокси-конце. Как правило, это короткие последовательности из 5 или около того неполярных оснований. Искусственное добавление таких "ярлыков" к стабильным в норме белкам делает их субстратами для протеаз. Недавно был обнаружен еще один "ярлык" такого рода. Когда молекула мРНК внезапно обрывается посреди кодирующей последовательности в результате деградации либо просто в результате преждевременной терминации транскрипции, рибосома оказывается в состоянии с занятым пептидил-тРНК Р-сайтом и свободным от кодона (и, соответственно, аминоацил-тРНК) А-сайтом (акцепторным сайтом). В этих условиях небольшая стабильная РНК, *ssrA*, действует сначала как аланил-тРНК, добавляя остаток аланина к пептиду, а затем как короткая мРНК, добавляя 10 неполярных аминокислот, за кодонами которых следует стоп. В результате образуется пептид, несущий на своем карбокси-конце 11 дополнительных АК, направляющих пептид на протеолиз (в периплазме при помощи Tsr, а в цитоплазме - HflB или ClpXP протеаз). В случае же денатурированных или агрегированных белков, не имеющих специфического "ярлыка", вопрос о том, как клетка определяет их дальнейшую судьбу, остается открытым.

АТФ-зависимые протеазы

В отличие от эукариот, где множественные системы мечения белков убихитином направляют различные субстраты к единственной цитоплазматической протеазе (26S протеазе), за распознавание субстрата у прокариот отвечают сами протеазы, поэтому их в клетке, как правило, несколько (порядка шести). Энергозависимые протеазы представляют собой, как правило, крупные олигомерные комплексы. Для всех протеаз этого класса с известной структурой протеазные сайты располагаются во внутренней камере олигомера, вход в которую слишком мал для большинства нативных (свернутых) белков. Поступление субстрата внутрь такой полости обеспечивается регуляторными АТФазными доменами (или субъединицами). Не удивительно, что именно АТФазные субъединицы отвечают за субстратную специфичность. Аминокислотные последовательности АТФазных субъединиц разных

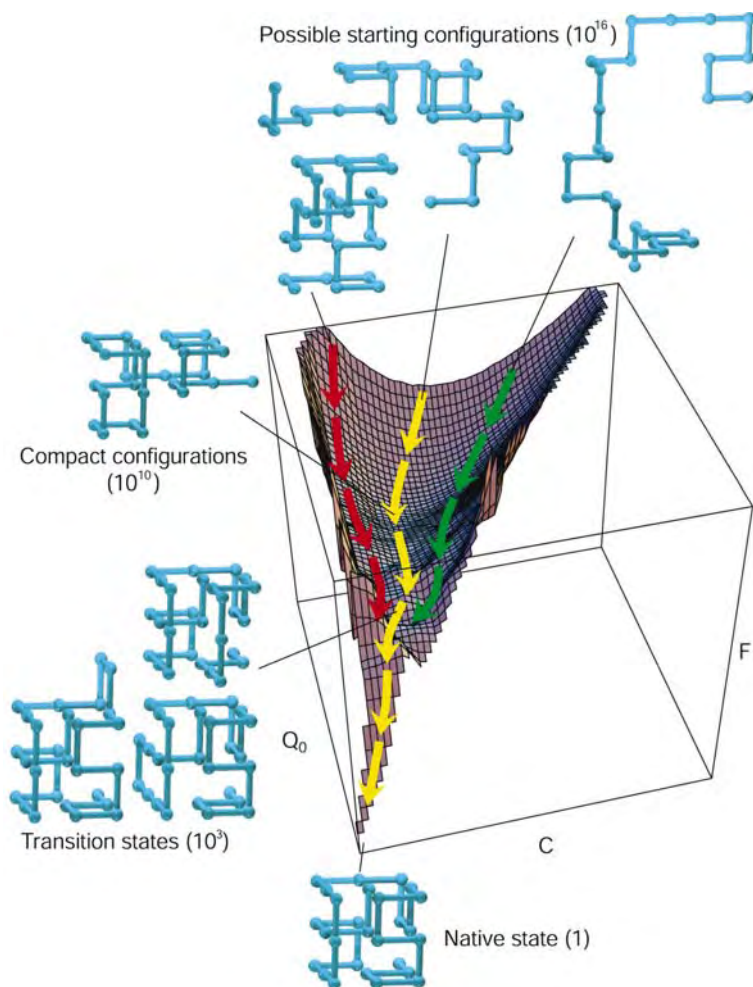


Рис. 4.4. Модель фолдинга короткого пептида

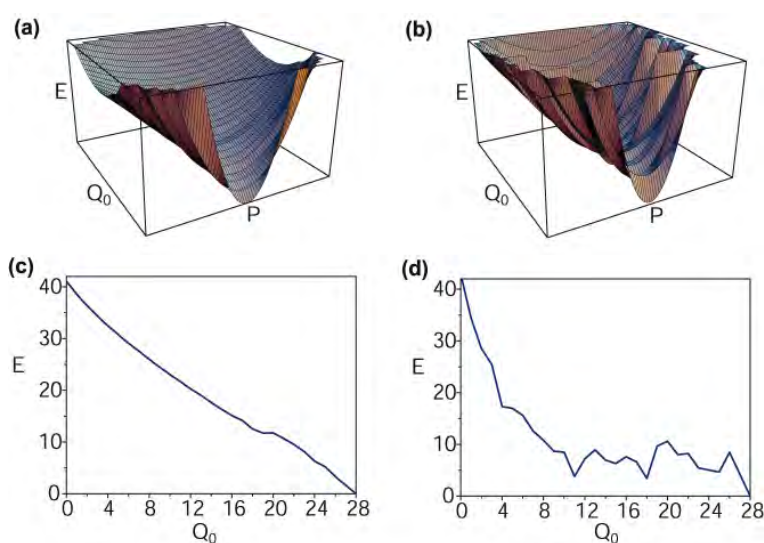


Рис. 4.5. Изменение свободной энергии в процессе фолдинга

последовательности АТФазных субъединиц разных

протеаз имеют сходство, которое может свидетельствовать о сходстве механизмов их действия. Поскольку распознавание субстратов осуществляется регуляторными АТФазами, свойства субстратов, приводящие к их деградации, не зависят от свойств, необходимых для разрезания пептидных связей. Как только белок распознается и связывается регуляторным АТФазным доменом, начинается последовательная деградация полипептидной цепи с разрезами через каждые 5-10 АК.

У *E.coli* известны 4 АТФ-зависимые протеазы.

ClpAP ClpXP.

У этих протеаз АТФазная и протеазная активность принадлежат разным субъединицам, и неудивительно, что эти субъединицы способны действовать самостоятельно (Рис. 4.6). ClpA и ClpX могут действовать как шапероны. Гены *clpX* и *clpP* составляют оперон, *clpA* расположен отдельно в моноцистронном опероне. Оба оперона имеют типичные промоторы теплового шока.

ClpYQ/HslUV

HflB(FtsH)

Zn и АТФ-зависимая протеаза, участвующая в деградации цитоплазматических и мембранных белков, включая RpoH, SecY (часть аппарата секреции). Единственная АТФ-зависимая протеаза, существенная для жизни *E. coli*. В опероне с RpoH-зависимым промотором.

Lon.

Деградирует белок N фага λ , ингибитор клеточного деления SulA, позитивный регулятор биосинтеза капсулы RcsA и др. Кроме специфических мишеней, Lon деградирует большинство аномальных белков *E. coli*. Белок – гомотетрамер, имеет сайты связывания с АТФ и ДНК, причем связывание с ДНК стимулирует протеазную активность. Транскрибируется с промотора теплового шока. В белке можно выделить два домена – собственно протеазный с карбоксильного конца с сериновым остатком в активном сайте и следующий за ним АТФазный. Экспериментально показано, что эти два домена могут быть экспрессированы как отдельные полипептиды, смесь которых функционально соответствует интактной протеазе Lon.

Регуляция синтеза белков теплового шока.

Шапероны и клеточные протеазы входят в состав регулона σ^{32} вместе с другими белками теплового шока (Рис. 4.7). Кроме того, в состав уже рассмотренного нами ранее регулона σ^E входят периплазматическая протеаза и шаперон. В последнее время было выяснено, что эти два регулона взаимосвязаны,

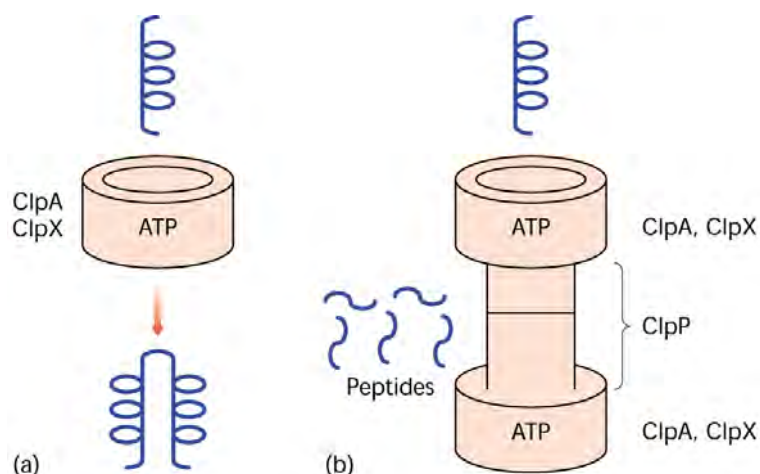


Рис. 4.6. АТФ-зависимые протеазы: шаперон и протеаза в одной молекуле

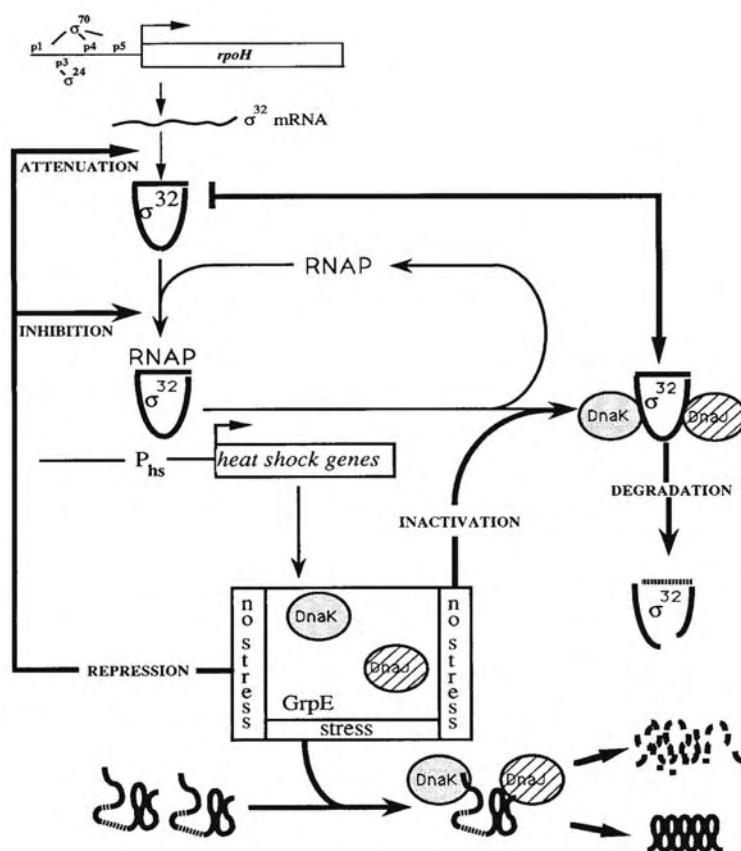


Рис. 4.7. Регуляция теплового шока у *Escherichia coli*

т.к. комплекс кора РНК-полимеразы с σ^E активирует транскрипцию гена *rpoH*, кодирующего σ^{32} , при экстремальных температурах (напр, 50°C). Многие протеобактерии имеют гомологи RpoH, и у них механизмы регуляции теплового шока являются схожими, тогда как грамположительные бактерии выработали другие, причем достаточно разнообразные, регуляторные стратегии для конкретных генов теплового шока.

У клеток *E. coli*, перемещенных с 30° на 42°, уровень внутриклеточного σ^{32} резко (хотя и ненадолго) возрастает, усиливая транскрипцию с промоторов теплового шока. Возрастание концентрации σ^{32} является результатом стабилизации обычно весьма нестабильного σ^{32} и активации трансляции уже существующей мРНК *rpoH*. Поскольку быстрая деградация σ^{32} зависит от шаперонного комплекса DnaK-DnaJ-GrpE, стабилизация происходит из-за того, что шаперон загружается огромным количеством индуцированных стрессом неправильных белков и его уже не хватает для обработки σ^{32} . В фазе адаптации, следующей за фазой индукции, синтез HSP снижается негативной обратной связью на нескольких уровнях экспрессии (трансляционная репрессия, дестабилизация и, возможно, инаktivация σ^{32}). Количество шаперона DnaK-DnaJ в клетке невелико, поэтому он является весьма чувствительным средством мониторинга стрессов. В деградации σ^{32} наибольшую роль играет, вероятно, связанная с мембраной АТФ-зависимая протеаза HflB (FtsH). Несколько цитоплазматических протеаз (HslVU, ClpAP и Lon), в норме отвечающих за деградацию аномальных белков, также способны деградировать σ^{32} . Таким образом внутриклеточные протеазы вместе с шапероном DnaK-DnaJ способны регулировать тепловой шок, контролируя внутриклеточную концентрацию аномальных белков. Шапероны, конечно, не деградируют σ^{32} непосредственно. Вступая в ассоциацию с РНК-полимеразой, σ^{32} стабилизируется и становится нечувствительной к протеолизу. Роль шаперонов заключается в предотвращении связывания σ^{32} с РНК-полимеразой, что позволяет протеазам ее деградировать.

Индукция трансляции σ^{32} происходит независимо не только от шаперонов, но и вообще от каких бы то ни было регуляторных белков. 5' область мРНК *rpoH* имеет уникальную вторичную структуру, закрывающую рибосомсвязывающий сайт. Эта структура стабильна при нормальной температуре, но денатурирует при ее повышении, что освобождает последовательность Шайн-Далгарно и позволяет инициировать трансляцию.

Транскрипция *rpoH* может инициироваться с четырех промоторов, один из которых зависит от σ^E , и регулируется белком DnaA и комплексом cAMP-CRP. Когда клетки *E. coli* подвергаются воздействию очень высоких температур, синтез почти всех белков в клетке прекращается. Исключения составляют лишь несколько белков, включая членов регулона σ^E (σ^{32} - один из таких белков). Другими членами этого регулона являются периплазматические протеаза DegP (HtrA) шаперон (пептидил-пролил цис-транс изомераза) FkpA, которые способствуют соответственно деградации и фолдингу поврежденных белков в периплазме. Мы уже рассматривали этот регулон раньше, поэтому пару слов о его регуляции при повышенной температуре. Как уже говорилось выше, активность σ^E контролируется парой белков, RseA и RseB. Белок цитоплазматической мембраны RseA является анти-сигма фактором и репрессирует σ^E регулон, связываясь с σ^E и предотвращая его взаимодействие с промоторами. Периплазматический белок RseB взаимодействует с RseA и способствует инаktivации σ^E . Когда же в периплазме накапливаются аномальные белки, RseB с ними взаимодействует, освобождая RseA, что ведет к ослаблению связи последнего с σ^E . Кроме того, важным результатом повышения температуры является изменение свойств мембраны - она становится более лабильной (становится "жиже"), что также способствует изменению конформации RseA, ослабляющему взаимодействие с σ^E .

Регуляция теплового шока у грамположительных бактерий.

Регуляторные стратегии у этих бактерий существенно отличаются от таковых *E. coli*, хотя некоторые принципы остаются. У *B. subtilis* гены теплового шока могут быть разделены по крайней мере на три класса.

Гены первого класса (регулон CIRCE/HrcA) кодируют синтез основных шаперонов DnaKJ-GrpE и GroEL-GroES, и их экспрессия негативно контролируется репрессором HrcA, первым геном оперона *dnaK*. Действие этого репрессора осуществляется через связывание с оператором - инвертированным повтором CIRCE. Контроль этого регулона осуществляется при участии шаперонов, но, в отличие от контролируемой шапероном DnaKJ-GrpE деградации σ^{32} у *E. coli*, здесь регуляторную функцию выполняет GroEL-GroES. Этот шаперон необходим для фолдинга HrcA, а титрование шаперона образующимися в стрессовых условиях аномальными белками приводит к снижению активности HrcA

и усилению экспрессии оперонов *groE* и *dnaK*. Таким образом, у грамположительных бактерий GroE, а не DnaK играет основную роль в регуляции теплового шока.

Репрессор HrcA и CIRCE-элементы были обнаружены не только у грамположительных, но и у альфа-протеобактерий, цианобактерий, хламидий и спирохет, однако их роль в регуляции теплового шока варьирует.

Ко второму классу относится большая группа (50-100) генов, позитивно контролируемых сигма-фактором общего стресса σ^B , которые кроме тепла индуцируются еще и голоданием по глюкозе или кислороду. Этот сигма-фактор регулируется сложным каскадом белок-белковых взаимодействий (включая фосфорилирование).

К третьему классу относятся все остальные гены, не имеющие общей системы регуляции.

Литература:

1. Susan Gottesman. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Genet. 1996. 30:465–506
2. Susan Gottesman. Regulation by proteolysis: developmental switches. Current Opinion in Microbiology 1999, 2:142–147

5. Холодовой шок

Многие бактерии достаточно часто подвергаются холодовому шоку, т.е. воздействию температуры ниже оптимальной. Энтеробактерии, например, сталкиваются с этим стрессом при экскреции из организма животного, поэтому адаптация к холодовому шоку, обеспечивающая увеличение выживаемости этих бактерий в условиях пониженной температуры, представляет явное селективное преимущество. События, происходящие в бактериальной клетке при понижении температуры, в корне отличаются от происходящих при тепловом шоке, но также влияют на клетку весьма отрицательно. Понижение температуры не оказывает серьезного воздействия на клеточные белки (хотя их свойства и меняются, денатурации, в отличие от теплового шока, не происходит). Гораздо более сильные изменения претерпевает мембрана клетки - ее твердость увеличивается (она фактически замерзает), что затрагивает все связанные с мембраной функции. Клетка борется с этим путем снижения степени насыщенности мембранных липидов. Холодовой шок также вызывает стабилизацию вторичных структур РНК и ДНК, что ведет к снижению эффективности процессов трансляции, транскрипции и репликации ДНК. Клетка преодолевает негативные последствия холодового шока путем синтеза целого ряда белков, получивших название белков

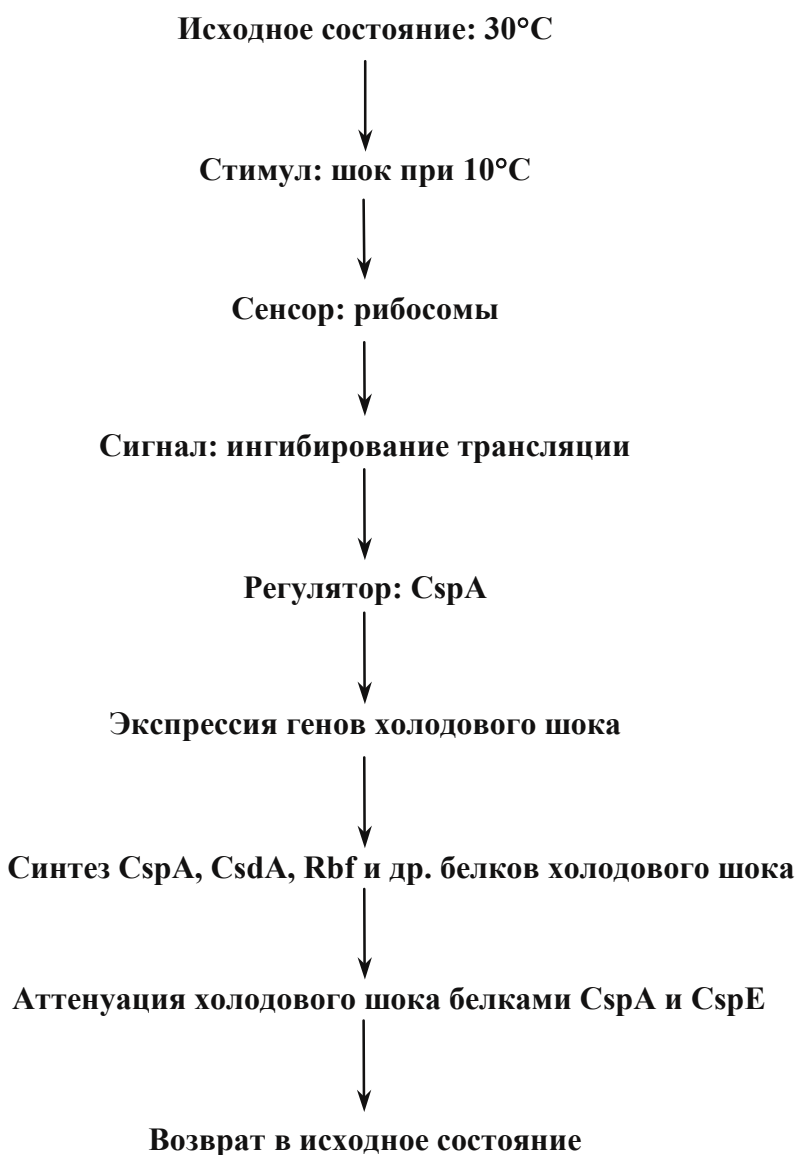


Рис. 5.1. Модель регуляции холодового шока

холодового шока (cold shock proteins, Csp).

Csp *E. coli* можно разделить на два класса. К первому относятся белки, практически отсутствующие у этих бактерий при 37°C и очень сильно индуцируемые при понижении температуры, ко второму - белки, присутствующие в клетке и при оптимальной температуре, но индуцируемые, хотя и не столь сильно (<10) при пониженной температуре.

К первому классу относятся белки CspA (основной белок холодового шока), CspB, CspG, CsdA, RbfA, NusA и PNP. CspA, CspB, CspG и CspI, действуют как шапероны для РНК и ДНК, CsdA - связанный с рибосомами белок, обладающий "раскручивающей" активностью по отношению к РНК (хеликаза), RbfA - рибосомсвязывающий фактор, NusA участвует в терминации и антитерминации транскрипции, а PNP - рибонуклеаза.

Ко второму классу относятся рекомбиназа RecA, фактор инициации трансляции IF-2, ДНК-связывающий белок нуклеоида H-NS и субъединица ДНК гиразы GyrA.

Около 10% всего белка, синтезируемого в клетке непосредственно после понижения температуры, составляет CspA, основной белок холодового шока *E. coli*. Эта бактерия имеет еще 8 белков, гомологичных CspA - CspB - CspI, но не все из них индуцируются холодом. Четко показана индукция для CspA, CspB, CspG и CspI. Несмотря на конститутивные промоторы, экспрессия этих белков четко контролируется. Гены этих четырех белков имеют необычно длинные высоко консервативные нетранслируемые области на своем 5' конце (5' UTR). Показано, что эта область существенна для экспрессии *cspA* и содержит последовательность из 11 оснований, называемую "cold box". Эта последовательность - место транскрипционной "паузы", приводящей к аттенуации транскрипции *cspA*. Причем регуляторной молекулой здесь является сам CspA. РНК-полимераза каким-то образом преодолевает терминаторный сайт непосредственно после понижения температуры, что ведет к усилению транскрипции *cspA*. Оказалось, что антитерминаторной молекулой является сам CspA, а также CspE и CspC, причем наиболее сильным антитерминатором из этих трех белков является CspE. (Антитерминация в данном случае происходит просто в результате дестабилизации вторичных структур, в том числе и терминаторных шпилек, Csp белками. Никакого взаимодействия с РНК-полимеразой и (или) Nus белками не наблюдается.) С другой стороны, накапливающийся CspA связывается со своей собственной РНК, вызывая аттенуацию, что ведет к последующему снижению концентрации белка в фазе адаптации. Кроме того, 5' UTR область отвечает за чрезвычайную нестабильность мРНК *cspA* при 37°, и эта же область необходима для стабилизации мРНК при понижении температуры. Очень сильная стабилизация мРНК *cspA* непосредственно после понижения температуры (время полужизни ее увеличивается с 12 секунд до 20 минут) является еще одним механизмом регуляции концентрации белка CspA. Такая стабилизация является временной и прекращается, как только клетки адаптируются к пониженной температуре. (механизм стабилизации неясен)

Экспрессия CspA регулируется также на уровне трансляции. Помимо последовательности Шайн-Далгарно, мРНК *cspA* имеет дополнительную область, комплементарную самому концу 16S рРНК, расположенную на расстоянии 14 н.п. после иницирующего кодона, так называемый "downstream box" (DB). Такая последовательность была идентифицирована также у *cspB*, *cspG*, *csdA* и *rbfA*. Оказывается, при 15° рибосомы не могут нормально иницировать трансляцию. DB последовательность усиливает инициацию трансляции за счет дополнительного связывания с 16S рРНК. Гены, имеющие DB последовательность, обходятся без дополнительных рибосомных факторов, необходимых для инициации трансляции при пониженной температуре. Неудивительно, что такими факторами являются RbfA и CsdA. Таким образом, рибосомы являются физиологическим сенсором холодового шока - при понижении температуры они становятся неспособными иницировать трансляцию всех клеточных мРНК, за исключением мРНК белков холодового шока. Однако после фазы адаптации, в течение которой синтезируются дополнительные факторы инициации RbfA и CsdA, рибосомы снова становятся в состоянии транслировать все мРНК.

Не все гомологи белка CspA индуцируются при понижении температуры. CspD сильно индуцируется в стационарной фазе и при голодании по глюкозе, причем эта индукция не зависит от RpoS. CspC и CspE экспрессируются конститутивно при 37°. Очевидно, что это семейство гомологичных генов произошло от общего предшественника, однако последующая адаптация привела к приспособлению части гомологов для выполнения специфических функций.

Из всех белков холодового шока третичная структура известна только для CspA. Этот белок представляет собой β -бочонок, состоящий из 5 антипараллельных β -слоев. Белок имеет два сайта связывания с РНК. Гидрофильные взаимодействия между белком и нуклеиновой кислотой осуществляются через 7 ароматических аминокислотных остатков, расположенных на поверхности молекулы белка. Белок в целом имеет негативно заряженную поверхность с положительно заряженными сайтами связывания нуклеиновых кислот. После связывания белка с РНК нуклеиновая кислота уже не сможет образовать вторичную структуру из-за электростатического отталкивания с поверхностью белка. Такая структура CspA является идеальной для его шаперонной активности.

Литература:

1. S. Phadtare, J. Alsina and M. Inouye. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology* 1999, 2:175–180
 2. W. Bae, B. Xia, M. Inouye and K. Severinov. Escherichia coli CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *PNAS* 2000 97(14):7784–7789
 3. S. Phadtare and M. Inouye. Sequence-selective interactions with RNA by CspB, CspC and CspE, members of the CspA family of Escherichia coli. *Molecular Microbiology* (1999) 33(5), 1004-1014
-

6. Сенсорные системы

Для бактерий (как, впрочем, и для любого другого организма) способность координировать экспрессию генов с изменениями условий окружающей среды дает существенное селективное преимущество. Адаптация бактерий к изменяющимся условиям среды контролируется белковыми системами передачи сигнала. Такие системы состоят из белковых модулей-доменов, собранных в несколько молекул, количество которых варьирует в зависимости от вида бактерии и конкретного фактора среды. Основными компонентами сенсорных систем являются:

сенсоры (трансмембранные или цитоплазматические), детектирующие изменения окружающих условий;

внутриклеточные посредники, получающие информацию от сенсоров и передающие ее на эффекторы;

эффекторы - непосредственные регуляторы физиологического ответа (как правило, на уровне транскрипции).

Трансмембранные рецепторы.

Что и как детектируется?

Механизм детекции сигнала не совсем ясен.

Детектируемый сигнал может быть как вне-, так и внутриклеточным. В некоторых случаях показано, что сигнал детектируется периплазматическим доменом. Так, PhoQ - регулятор экспрессии факторов вирулентности у *Salmonella typhimurium*, - является сенсором дивалентных катионов, которые, связываясь непосредственно с периплазматическим доменом, стабилизируют неактивную конформацию PhoQ.

Сигнал может быть внутриклеточным. Рецептор Aег, участвующий в регуляции азотаксиса, детектирует внутриклеточный запас энергии, связываясь с FAD. Еще один пример – детекция внутриклеточной концентрации глутамата при регуляции азотного метаболизма.

В ряде случаев показано, что сенсором является трансмембранный домен. Так, Cpx-путь активирован у мутантов *E. coli*, лишенных фосфатидилэтаноламина - таким образом, простое нарушение мембранной структуры приводит к активации этого сигнального пути. У белка EnvZ *E. coli* - гистидинкиназы, участвующей в осморегуляции, периплазматический домен может быть делетирован без потери сенсорной функции.

Механизм передачи сигнала.

Многие бактериальные рецепторы имеют периплазматический домен-детектор (Р) и цитоплазматический сигнальный домен (С), закоренные в мембране двумя α -спиральными

трансмембранными сегментами. Линейная структура таких белков может быть представлена как TM1–P–TM2–L–C, где L - цитоплазматический линкер

Сигнальный домен либо сам является гистидинкиназой (EnvZ) либо с гистидинкиназой взаимодействует (MCP рецепторы хемотаксиса).

Механизм передачи сигнала с сенсорного на сигнальный домен неясен. Рецепторы обычно являются мембранными белками, гомодимерами. Предполагалось, что конформационные изменения, возникающие при связывании субстрата, передаются через мембрану на цитоплазматические домены рецептора, что влияет на взаимодействие сигнальных доменов между собой. Однако делеция одного из двух сигнальных доменов (равно как и удаление всех трансмембранных сегментов) у димера не лишает его активности.

Двухкомпонентные системы

В конце 80-х слово "двухкомпонентные" было использовано для обозначения нового класса регуляторных систем, найденных у бактерий. На сегодняшний день описаны сотни таких систем у бактерий, архей и некоторых эукариот. Двухкомпонентные системы выступают в качестве основного механизма сопряжения реакции со стимулом, позволяющего организмам реагировать на многие изменения условий окружающей среды. Эти сигнальные системы достаточно сложны и характеризуются модульной организацией, хорошо адаптированной ко многим клеточным сигнальным путям и интегрированной с ними.

Типичная двухкомпонентная система состоит из двух белков – гистидиновой протеинкиназы (ГК), содержащей консервативный киназный домен и регулятора ответа (РО), содержащего консервативный регуляторный домен. Внеклеточные сигналы детектируются ГК, что приводит к изменению ее активности. Затем ГК передает фосфогруппу на РО (реакцию катализирует сам РО). Перенос фосфата на РО приводит к активации эффекторного домена этого белка, что и вызывает в конечном итоге специфический физиологический ответ.

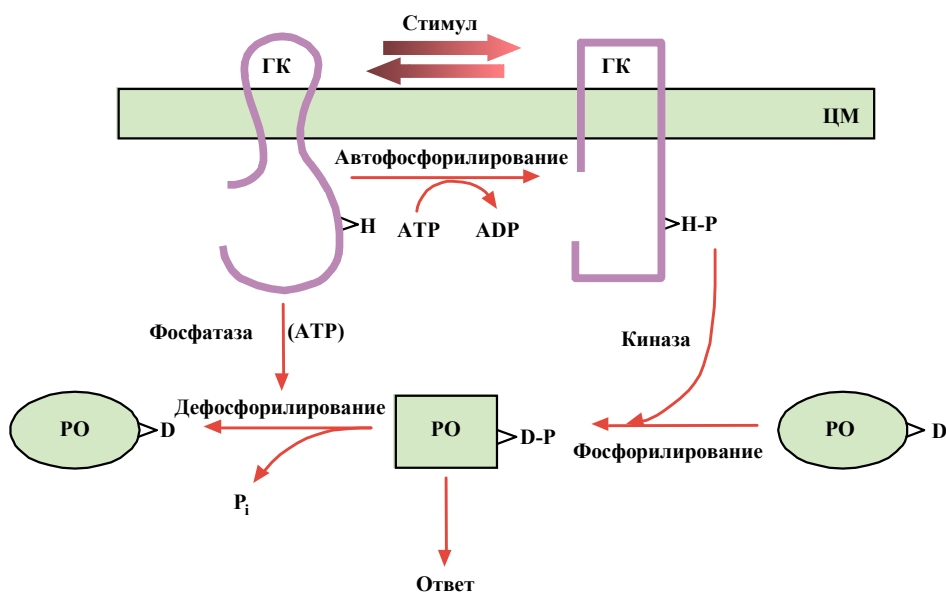


Рис. 6.1. Модель двухкомпонентной регуляторной системы
ГК- гистидинкиназа, РО – регулятор ответа, Н – консервативный гистидиновый остаток ГК, D – консервативный остаток аспарагиновой кислоты РО

В основе работы двухкомпонентной системы лежат три реакции, дающие два фосфорилированных продукта:

1. Автофосфорилирование ГК:

$$\text{ГК-His} + \text{АТФ} \rightleftharpoons \text{ГК-His}\sim\text{Ф} + \text{АДФ}$$
2. Перенос фосфата:

$$\text{ГК-His}\sim\text{Ф} + \text{РО-Asp} \rightleftharpoons \text{ГК-His} + \text{РО-Asp}\sim\text{Ф}$$
3. Дефосфорилирование:

$$\text{РО-Asp}\sim\text{Ф} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{РО-Asp} + \text{P}_i$$

γ-фосфат из АТФ сначала переносится на боковую цепь консервативного гистидинового остатка ГК (1). Затем РО катализирует перенос фосфата от фосфогистидина на аспартатный остаток своего регуляторного домена (2). Наконец, фосфат переносится от фосфоаспартата к воде в реакции гидролиза (3).

Хоть ГК и похожи по своей основной функции (фосфорилирование белков) на "классические" Ser/Thr/Tyr киназы, химизм реакции принципиально отличается – ГК образует не фосфоэфирную, а фосфоамидную связь. Реакция гидролиза фосфоамидной связи имеет гораздо большее отрицательное значение ΔG по сравнению с гидролизом фосфоэфирной связи, поэтому равновесие р-и (1) сдвинуто в сторону нефосфорилированного белка ГК. Следовательно, только очень небольшой процент ГК существует в фосфорилированном виде => не фосфорилирование ГК как таковое, а перенос фосфата является основным в работе этого фермента. Богатая энергией связь N~P идеально подходит для передачи фосфата. Именно поэтому такая же связь используется хорошо знакомыми вам ферментами I и II ФТС, основной функцией которых является также не фосфорилирование как таковое, а передача фосфата "по цепочке" в направлении его конечного акцептора – фосфорилируемого сахара.

В молекуле РО фосфорилируется остаток аспартата. Предположительно, именно этот остаток используется, т.к. фосфорилирование его длинной ацильной цепи вызывает протяженные конформационные изменения в молекуле РО, необходимые для изменения эффекторной активности. Еще одним важным свойством фосфоаспартата является быстрый гидролиз ацилфосфата как в кислой, так и в щелочной среде. К тому же, многие РО имеют автофосфатазную активность, еще более уменьшающую время полужизни фосфоаспартата.

Таким образом, основным результатом выбора для фосфорилирования специфических остатков в молекулах ГК и РО является высокая мобильность системы. При отсутствии стимула оба компонента будут дефосфорилированы. Детекция стимула гистидинкиназой вызовет ее фосфорилирование и очень быструю передачу фосфата молекуле регулятора ответа, что приведет к быстрому ответу бактерии на изменившиеся условия. В свою очередь, легкость дефосфорилирования молекулы РО приведет к быстрому возвращению всей регуляторной системы, а вместе с ней и метаболизма бактериальной клетки, в исходное (нефосфорилированное) состояние при исчезновении стимула, вызвавшего первоначальное фосфорилирование ГК.

Распространенность двухкомпонентных систем

Двухкомпонентные сигнальные системы с участием фосфорилируемых остатков гистидина и аспартата наиболее часто встречаются у бактерий. Несмотря на обнаружение таких систем у эукариот, здесь в сигнальных цепях доминируют сигнальные каскады с переносом фосфата между остатками серина, треонина и тирозина. С другой стороны, Ser/Thr/Tyr киназы у прокариот тоже имеются. Пока нет удовлетворительного объяснения предпочтительному использованию той или иной системы у про- и эукариот. Количество генов, кодирующих белки двухкомпонентных систем, значительно варьирует в геномах различных организмов – от 0 у *Mycoplasma genitalium* до 2.5% генома у *Synechocystis* sp. В полностью сиквенированных геномах общее количество ГК и РО следующее:

Mycoplasma genitalium – 0

Haemophilus influenzae – 9

Helicobacter pylori – 11

Thermotoga maritima -19

Escherichia coli – 62

Bacillus subtilis - 70

Synechocystis sp. – 80

Methanococcus jannaschii – 0

Methanobacterium thermoautotrophicum - 24

Caenorhabditis elegans – 0

Saccharomyces cerevisiae – 4 (одна система)

У эукариот пока описаны лишь единичные примеры ГК и РО, однако у некоторых организмов их число больше – так, у слизевика *Dictyostelium discoideum* имеется как минимум 11 ГК. Кроме того, эукариотические системы имеют ряд отличий от прокариотических. Прежде всего, гибридные ГК,

содержащие и РО домен, редки у прокариот (5 из 30 ГК у *E. coli*), тогда как у эукариот все описанные ГК гибридные (с пока единственным исключением). Прокариотические РО являются, как правило, транскрипционными факторами, тогда как только один из описанных пока эукариотических РО имеет ДНК-связывающий домен.

Структура и функции гистидиновых протеинкиназ

У типичных двухкомпонентных систем сенсорные ГК "следят" за внешними стимулами и передают полученную информацию РО путем его фосфорилирования. ГК, как правило, содержит две основных "части" – характеризующуюся большим разнообразием сенсорную и консервативную киназную. Общая активность киназы модулируется сигналами, детектируемыми сенсорным доменом. ГК претерпевает АТФ-зависимое автофосфорилирование по инвариантному гистидиновому остатку, расположенному в киназном же домене. ГК – димер, причем в реакции автофосфорилирования один мономер ГК фосфорилирует консервативный гистидиновый остаток другого. В отличие от типичных киназных каскадов, в которых одна киназа имеет множество мишеней, в случае двухкомпонентных систем РО стехиометрически переносит фосфат с фосфо-ГК на консервативный Asp своего регуляторного домена. К тому же многие ГК имеют фосфатазную активность, позволяющую им дефосфорилировать свой РО. Такие ГК используются при необходимости быстро "выключать" сигнальную цепочку.

ГК исключительно разнообразны, и все это разнообразие было создано за счет простых комбинаций сенсорных, каталитических и вспомогательных доменов (Рис. 6.2). Модульная структура этих белков позволяет адаптировать свойства каждой ГК к специфическим нуждам конкретной сигнальной системы. Различные ГК имеют размер в пределах 40-200 kDa. Более крупные ГК могут состоять из 5-6 структурно и функционально различных доменов. Несмотря на такое разнообразие ГК могут быть разделены на два больших класса: классические и гибридные.

Наиболее "традиционные" ГК, например, осмосенсор EnvZ из *E. coli*, действуют как мембранные рецепторы с сенсорным доменом, расположенным в периплазме. EnvZ имеет две трансмембранных α -спирали, которые разделяют белок на периплазматический аминоконцевой сенсорный домен и цитоплазматический карбоксиконцевой киназный домен. Другие ГК могут иметь больше трансмембранных сегментов (до 4-8) или не иметь их вовсе (киназы хемотаксиса CheA и азотного регулона NtrB). В последнем случае ГК являются цитоплазматическими и детектируют внутриклеточные изменения (непосредственно либо в результате взаимодействия с цитоплазматическими регуляторными белками).

ГК, принадлежащие ко второму классу, гибридных ГК, имеют множественные донорные и акцепторные сайты для передачи фосфата. Вместо одного акта передачи фосфата гибридные ГК используют многоступенчатые схемы "ретрансляции" сигнала фосфорилирования. Сложность общей структуры гибридных ГК позволяет иметь несколько "входов", а иногда и "выходов" для одного сигнального пути. Типичным представителем гибридных ГК является белок ArcB, регулятор активности ряда генов в анаэробных условиях. ArcB имеет два N-концевых трансмембранных сегмента, за которым следуют киназный домен, затем домен, сходный с регуляторным у РО и, наконец,

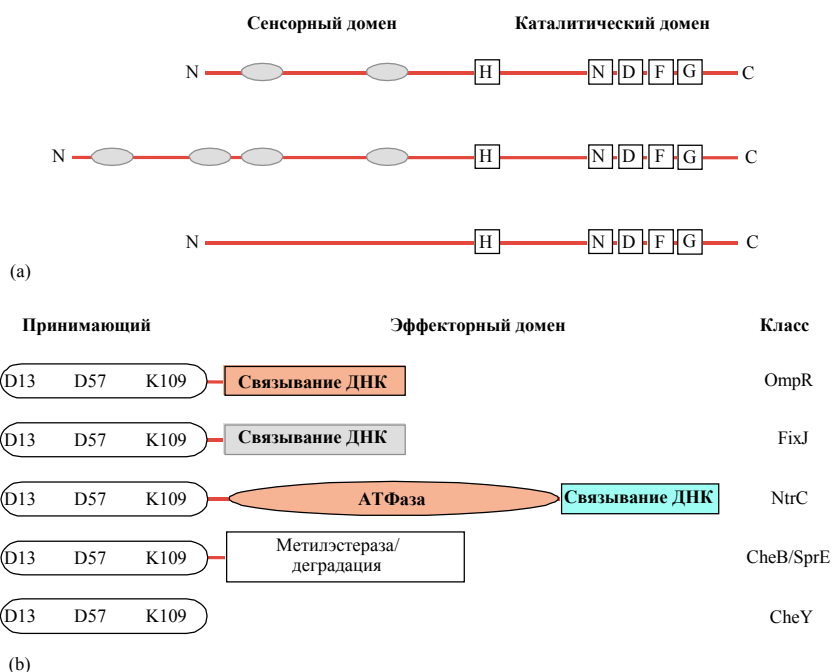


Рис. 6.2. Доменная организация гистидинкиназ (а) и регуляторов ответа (б).

Серыми овалами обозначены трансмембранные домены. Консервативные участки каталитических доменов обозначены буквами.

второй гистидинсодержащий домен, называемый HPt-домен (от His-containing phosphotransfer – гистидинсодержащий фосфатпереносящий)

Каталитическое киназное ядро.

Унифицирующим структурным свойством семейства ГК является характерное киназное ядро, состоящее из домена димеризации и АТФ/АДФ-связывающего фосфотрансферного или каталитического домена.

Киназное ядро имеет размер ~350 АК и отвечает за связывание АТФ и осуществление киназной реакции. Консервативный остаток гистидина, являющийся субстратом киназной реакции, располагается в домене димеризации.

HPt-домены

у прокариот встречаются исключительно в составе гибридных киназ, тогда как у эукариот – как отдельные белки. Эти домены имеют размер около 120 АК и содержат остаток гистидина, способный участвовать в фосфотрансферных реакциях. HPt-домены не имеют ни киназной, ни фосфатазной активности, поэтому они идеально приспособлены для коммуникации между различными белками. Интересно, что при всем разнообразии первичных последовательностей HPt-доменов их третичная структура очень схожа и напоминает таковую домена димеризации киназного ядра, включая расположение консервативного гистидинового остатка.

Сенсорный домен

Изменения в окружающей среде детектируются непосредственно (или опосредованно) аминоконцевым сенсорным доменом ГК. Между разнообразными мембранными сенсорными доменами практически полностью отсутствует сходство на уровне первичной последовательности, что поддерживает идею о специфичности детектируемых ими взаимодействий. В большинстве случаев специфический стимул и механизм его детекции остаются неизвестными. Информация о трехмерной структуре этих доменов начинает появляться только сейчас, поэтому как сигнал передается к киназному ядру, пока не ясно.

Примером цитоплазматических сенсоров являются PAS-домены. Эти универсальные модули "чувствуют" изменения освещенности, окислительно-восстановительного потенциала, концентрации кислорода и небольших лигандов. Имя домена происходит от первых букв названий трех эукариотических белков, в которых он был впервые обнаружен. С доменом обычно связана одна из нескольких простетических групп, которые как раз и определяют распознавание разнообразных сигналов. Такими кофакторами могут быть, например, гем, ФАД, ФМН и т.д. PAS-домены имеют небольшой размер (~100 АК) и располагаются перед (ближе к N-концу) киназным ядром, как правило, после одной или нескольких пар трансмембранных сегментов. Таким образом, цитоплазматические сенсоры с PAS-доменами тоже являются мембранными белками. Однако имеются и не связанные с мембраной цитоплазматические сенсоры, например, NtrB, участвующий в регуляции азотного метаболизма.

(более подробно о сенсорных доменах и механизме работы трансмембранных сенсорных ГК поговорим в разделе о хемотаксисе).

Линкерный домен

У трансмембранных ГК периплазматический сенсорный домен соединяется с цитоплазматическим киназным ядром при помощи трансмембранной α -спирали и цитоплазматического линкера. Линкерные домены совершенно необходимы для нормального функционирования сенсорных ГК, однако об их функциях известно немного. Размер линкеров варьирует в пределах 40-180 АК. Многие из них имеют характерный α -спиральный coiled coil мотив, в большинстве случаев предшествующий фосфорилируемому гистидиновому остатку киназного ядра. Две наиболее вероятные функции линкерных доменов – правильное расположение мономеров в димере ГК и передача сигнала от сенсорной к киназной части белка.

Структура и функции регуляторов ответа

Активности и структура

У большинства прокариот РО – конечное звено сигнального пути, функционирующее как зависящий от фосфорилирования "выключатель" адаптивного ответа. РО катализирует перенос фосфата от фосfogистидина ГК к консервативному остатку аспартата в своем регуляторном домене. Большинство РО также катализируют автодефосфорилирование, что ограничивает время пребывания

белка в активированном состоянии. Фосфорилирование РО приводит к его конформационному изменению, затрагивающему значительную часть поверхности РО. Изменение поверхности позволяет происходить новым внутри- и межмолекулярным взаимодействиям, которые и вызывают адаптивный ответ. Такой принцип работы РО делает возможным многообразные регуляторные механизмы, оптимизированные для различных эффекторных функций в различных системах.

Большинство РО состоит из двух доменов: консервативного аминоконцевого регуляторного и варьирующего карбоксиконцевого эффекторного. Большинство РО являются транскрипционными факторами с ДНК-связывающими эффекторными доменами (25 из 32 РО у *E. coli*). ДНК-связывающие домены могут быть разделены на три группы, представленные OmpR, NarL и NtrC (соответственно 14, 7 и 4 члена). Не все РО имеют ДНК-связывающие домены. Карбоксиконцевые домены некоторых РО являются ферментами, как, например, метилтрансфераза CheV, участвующая в хемотаксисе. Некоторые РО вообще лишены эффекторного домена. Примером такого белка является опять же белок хемотаксиса CheY, который функционирует путем взаимодействия с эффекторным белком FliM, компонентом жгутикового мотора.

Регуляторный домен.

Наиболее консервативная часть белка. содержит кластер остатков аспартата, которые связывают Mg^{2+} и формируют активный сайт для переноса фосфата

Эффекторный домен

Эффекторным доменам сложно дать общую характеристику по причине их большого разнообразия. Большинство эффекторных доменов имеет ДНК-связывающую активность и действует путем активации или репрессии транскрипции специфических генов. Тем не менее, узнаваемые последовательности ДНК, расположение сайтов связывания и механизм транскрипционной регуляции существенно различаются, даже у РО из одного подсемейства.

OmpR, детально охарактеризованный представитель самого большого подсемейства РО, действует и как активатор, и как репрессор, дифференциально регулируя экспрессию генов *ompC* и *ompF*, кодирующих порины внешней мембраны. Димеры OmpR последовательно связываются с F и C боксами, предшествующими пориновым генам. Белки-представители этого семейства связываются с ДНК посредством характерного мотива "крылатая спираль", состоящего из распознающей спирали, взаимодействующей с большой бороздкой в ДНК, и двух петель, или крыльев, по обе стороны спирали, которые взаимодействуют с малой бороздкой.

Второе подсемейство РО представляет NarL, – транскрипционный фактор, который и активирует, и репрессирует гены, участвующие в метаболизме нитрита и нитрата. NarL связывается со множественными "NarL гептамерами" – сайтами связывания – путем типичного НТН мотива.

Наиболее сложное как структурно, так и функционально подсемейство РО представлено регулятором азотного метаболизма NtrC – энхансером транскрипции, активирующим содержащий σ^{54} холофермент РНК-полимеразы. Эффекторная область белков этого подсемейства состоит из двух доменов – АТФазного и ДНК-связывающего НТН домена. Способные связываться с ДНК димеры NtrC после фосфорилирования олигомеризуются в октамеры. Олигомеризация стимулирует гидролиз АТФ что дает энергию для образования открытого комплекса и активации транскрипции.

Активация фосфорилированием.

Большое разнообразие эффекторных доменов ставит вопрос о том, как консервативный регуляторный домен может изменять активность таких разнообразных эффекторных доменов. Регуляторные домены РО существуют в виде находящейся в состоянии равновесия смеси активной и неактивной форм. Фосфорилирование регуляторного домена сдвигает равновесие в сторону активной формы, которая имеет существенно отличную поверхность. Различные молекулярные поверхности двух форм могут способствовать специфическим белок-белковым (или белок-ДНК) взаимодействиям. Поэтому любой тип регуляции, который может быть осуществлен за счет меж- или внутримолекулярных взаимодействий, может использоваться семейством РО.

Соответственно существуют различные механизмы активации РО. Каждый механизм основан на специфических регуляторных взаимодействиях присущих фосфорилированному и(или) нефосфорилированному регуляторному домену. В некоторых случаях активация происходит за счет снятия ингибирования. При этом РО обычно можно активировать путем делеции регуляторного домена. В других случаях фосфорилированный регуляторный домен играет активную роль. Фосфорилирование

может способствовать взаимодействию с другими белками либо ди- или олигомеризации. Так, связывание OmpR с соседними операторными участками усиливается при взаимодействии его субъединиц между собой, которое усиливается при фосфорилировании; фосфорилирование NtrC способствует его олигомеризации в энхансерной области, что активирует транскрипцию. Некоторые белки используют комбинацию этих механизмов. Фосфорилирование обычно соответствует активации, но есть и исключения.

Для двух РО с известной структурой известен точный механизм ингибирования эффекторного домена нефосфорилированным регуляторным доменом. В нефосфорилированном состоянии регуляторный домен экранирует активный сайт эффекторного домена, не давая последнему взаимодействовать с субстратом, каковым может являться ДНК (в случае транскрипционного фактора NarL) либо белок (рецептор хемотаксиса в случае метилэстеразы CheB, о которой мы поговорим чуть позже). Для обоих белков активация происходит за счет взаимного перемещения N- и C-концевых доменов в результате индуцированных фосфорилированием конформационных изменений.

Недавно определенные структуры фосфорилированных регуляторных доменов нескольких белков подтверждают, что фосфорилирование вызывает протяженные структурные изменения, затрагивающие молекулярную поверхность регуляторного домена. Фосфорилирование не изменяет общую третичную структуру и не вызывает существенных изменений во вторичной структуре. Единственным результатом фосфорилирования являются незначительные (на пару ангстрем) перемещения элементов вторичной структуры, которые, тем не менее, оказывают существенное влияние на молекулярную поверхность, изменяя ее топологические и электростатические характеристики.

Индукцированные фосфорилированием конформационные изменения затрагивают большую поверхность регуляторного домена, которая может быть использована во взаимодействиях со многими мишенями. И действительно, многие РО взаимодействуют с несколькими молекулами – ГК, вспомогательные фосфатазы, эффекторные домены, другие регуляторные домены в составе димеров и, возможно, компоненты транскрипционного аппарата.

Архитектура регуляторных систем

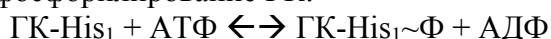
Элегантность двухкомпонентных систем заключается в их модулярности. Простейшая сигнальная система может состоять из одной пары ГК-РО. В более сложных случаях домены, входящие в состав ГК и РО, а также HPr-домены могут комбинироваться, образуя уже сигнальную цепочку или даже сеть, известную под названием фосфотрансляционная система (система передачи фосфата). Классические двухкомпонентные системы доминируют у прокариот, тогда как фосфотрансляционные системы чаще встречаются у эукариот (хотя прокариотические примеры тоже имеются). Дополнительная сложность фосфотрансляционных систем позволяет ввести дополнительные стадии контроля а также возможность взаимодействия между различными сигнальными путями.

Большинство регуляторных систем устроены просто. Трансмембранная сенсорная ГК посредством одной реакции передачи фосфата активирует цитоплазматический РО, который вызывает соответствующий адаптивный ответ. Типичным примером такой системы, использующей единичный перенос фосфата от His к Asp, является осморегуляторная пара EnvZ-OmpR, контролирующая экспрессию поринов внешней мембраны OmpF и OmpC. Есть и вариации на эту тему, когда несколько ГК могут фосфорилировать один РО или одна ГК контролирует несколько РО, но в любом случае для таких простых систем имеет место только один акт передачи фосфата в направлении His → Asp. Например, в системе контроля хемотаксиса одна ГК CheA фосфорилирует два РО, CheB и CheY. Еще более сложная ситуация встречается в системе контроля нитрат/нитрит-реагирующих генов, в которой две ГК, NarX и NarQ, контролируют два РО, NarL и NarP.

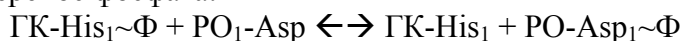
Фосфотрансляционные системы

Еще более усложненные версии двухкомпонентных систем используют более одного акта передачи фосфата. Такие сигнальные пути называют фосфотрансляционными системами (системами передачи фосфата). В простейшем случае фосфотрансляционная система удлиняет цепочку передачи фосфата на два шага, Asp → His и His → Asp. Таким образом, базовая фосфотрансляционная система имеет уже четыре фосфорилированных белковых продукта и пять реакций переноса фосфата:

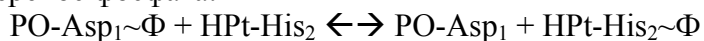
1. Автофосфорилирование ГК:



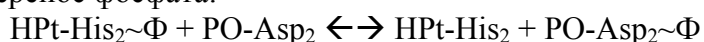
2. 1-й перенос фосфата:



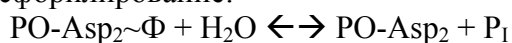
3. 2-й перенос фосфата:



4. 3-й перенос фосфата:



5. Дефосфорилирование:



В этой схеме в качестве фосфорилируемых субстратов используются домены, содержащие консервативные остатки гистидина и аспартата. Эти домены могут существовать как изолированные белки или же быть соединенными ковалентно, как это имеет место в случае уже описанных гибридных гистидинкиназ.

Система контроля споруляции *B. subtilis* (которую мы еще рассмотрим более подробно позднее) является примером His-Asp-His-Asp цепочки. В этой системе несколько ГК могут быть донорами фосфата для белка Spo0F. С Asp белка Spo0F фосфат затем переносится на HPt белок Spo0B и, наконец, на Asp транскрипционного фактора Spo0A.

Множественные фосфорилируемые домены фосфотрансляционных систем создают возможность альтернативных путей передачи фосфата. В гибридной ГК ArcB любой из имеющихся His-содержащих доменов (димеризационный или же HPt) может получить фосфат от АТФ и передать его PO ArcA. Два различных варианта используются в аэробных и анаэробных условиях.

Еще более сложная организация может достигаться за счет интеграции различных сигнальных цепочек в сигнальные сети. У *B. subtilis* практически каждая двухкомпонентная система взаимодействует с как минимум еще одной цепочкой передачи фосфата. В качестве примера такой интеграции можно привести взаимодействие путей, контролирующих утилизацию фосфата (PhoR/PhoP), аэробного и анаэробного дыхания (ResE/ResD) и споруляцию (KinA-B/Spo0A). Дыхание и утилизация фосфата регулируются совместно – фосфо-PhoP активирует экспрессию ResD и наоборот. Однако, когда клетка вступает на путь споруляции, и дыхание, и утилизация фосфата репрессируются, поскольку фосфо-Spo0A негативно регулирует фосфорилированные ResD и PhoP.

Регуляторные механизмы

Единственной видимой причиной, по которой регуляторные системы являются двух- (и более) – компонентными является сама необходимость контроля – двухступенчатый (или еще более сложный) сигнальный путь просто напросто создает те места, в которых клетка может контролировать поток информации. Различные регуляторные механизмы накладываются поверх базовых путей передачи фосфата, позволяя оптимизировать передачу фосфата для нужд каждой конкретной системы. Результатом работы некоторых систем является "количественный" ответ – так EnvZ-OmpR система обеспечивает различные уровни экспрессии генов поринов *ompF* и *ompC*. Другие регуляторные системы, как, например, система контроля споруляции у бацилл, дают качественный ответ типа "все или ничего". Вне зависимости от типа даваемого ответа любая система может иметь несколько уровней регуляции, зачастую с участием дополнительных белковых компонентов. Основными мишенями для такой регуляции являются активности ГК и дефосфорилирование PO.

Регуляция активности ГК.

ГК могут иметь две активности, способные контролировать уровень фосфорилирования PO: автокиназную и PO-фосфатазную. Не все ГК имеют фосфатазную активность – для некоторых возможна только регуляция автокиназной активности. С другой стороны, во многих системах именно фосфатазная активность подвержена основной регуляции.

У типичных трансмембранных ГК сенсорные домены непосредственно связываются с лигандами либо детектируют физические стимулы. В более сложных системах детекция сигналов может происходить через взаимодействие с другими белковыми компонентами. Например, автокиназная активность ГК хемотаксиса CheA, которая образует комплекс с хеморецепторами и адаптерным белком CheW, ингибируется либо активируется сигналами, передаваемыми от хеморецепторов (путем конформационных изменений). PO-фосфатазная активность цитоплазматической ГК NtrB регулируется

дополнительным белком P_{II}, чья способность взаимодействовать с NtrB зависит от его уридилированности, которая, в свою очередь, связана с концентрацией внутриклеточного азота. Активность ГК может также регулироваться дополнительными доменами. Например, сенсор тургора KdpD содержит дополнительных АТФ-связывающий домен, и связывание (но не гидролиз) АТФ необходимо для проявления фосфатазной активности.

Регуляция дефосфорилирования РО

Как мы уже обсуждали, многие РО имеют автофосфатазную активность, необходимую для поддержания надлежащих временных параметров системы (времени существования РО в фосфорилированном состоянии). На дефосфорилирование РО также может влиять фосфатазная активность ГК, регулируемая различными механизмами.

В дефосфорилировании некоторых РО участвуют вспомогательные белки. Система споруляции бацилл имеет набор строго регулируемых фосфатаз (RapA, RapB, RapE), которые дефосфорилируют Spo0F, и еще одну фосфатазу, которая дефосфорилирует Spo0A. В системе хемотаксиса вспомогательный белок CheZ олигомеризуется с фосфо-CheY и стимулирует его дефосфорилирование.

Фосфатазы фосфоаспартата имеют настолько высокую специфичность по отношению к белкам-субстратам, что возникает вопрос – действительно ли они непосредственно катализируют гидролиз или же просто стимулируют присущую РО автофосфатазную активность.

Другие способы регуляции

Некоторые системы могут иметь дополнительные и зачастую специфические механизмы контроля. Например, может регулироваться сам перенос фосфата. Так, у гибридной киназы VirA из *A. tumefaciens* карбоксиконцевой Asp-содержащий домен влияет на автокиназную активность киназного ядра путем физического взаимодействия с сайтом автофосфорилирования.

Дополнительная возможность регуляции создается в тех случаях, когда ГК фосфорилирует более одного РО. В этих случаях конкуренция за фосфат может влиять на активацию различных ветвей сигнального пути.

Наконец, еще один способ регуляции РО – контроль экспрессии его гена. Многие из двухкомпонентных систем, регулирующих транскрипцию, подвержены авторегуляции. В таких системах фосфо-РО действует как активатор или репрессор оперона, кодирующего ГК и РО.

Литература:

1. A.M. Stock, V.L. Robinson and P.N. Goudreau. Two-component signal transduction. Annu. Rev. Biochem. 2000. 69:183-215
-

7. Хемотаксис

7.1 Устройство и принцип действия двигательного аппарата бактерий

Движение бактерий мы рассмотрим на примере *E. coli* как наиболее изученной бактерии. Эта бактерия передвигается за счет вращения своих жгутиков, которые действуют, как винты корабля. Каждая бактерия может иметь шесть или более "винтов", разбросанных по поверхности клетки случайным образом. Хотя каждый "винт" вращается независимо, но при вращении против часовой стрелки нити жгутиков сближаются за счет гидродинамических сил и образуют пучок, вращающийся в одну сторону позади клетки. Вращение против часовой стрелки приводит к более-менее прямолинейному поступательному движению бактерии, тогда как вращение по часовой стрелке заставляет бактерию кувыркаться на месте (Рис. 7.1). В результате при последующем переключении направления вращения жгутика бактерия начнет двигаться в случайном направлении. В однородной среде бактерия кувыркается примерно раз в секунду.

Нить жгутика является тонкой ровной трубкой, созданной из уложенных спирально молекул одного единственного белка – флагеллина. Длина жгутикового филамента варьирует и может достигать 10 длин тела бактерии. Нить жгутика прикрепляется к базальному телу при помощи полого гибкого крюка. Крюк прикреплен к оси – полой прямой трубке, составляющей основу ротора жгутика. Ось окружена тремя кольцами – двойным MS кольцом, находящимся в цитоплазматической мембране и слегка выступающим из нее, Р кольцом в слое пептидогликана и L кольцом в наружной мембране. Специфическая для компонентов жгутика система секреции III типа, располагающаяся в базальном

теле, транспортирует через мембрану белки оси, крюка и нити в правильной последовательности и в нужных количествах. Секретируемые компоненты поступают к месту сборки формирующегося жгутика через полость в его центре. Предполагается, что белки-компоненты секреторного аппарата располагаются в основном на цитоплазматической стороне MS кольца (Рис. 7.2.).

Вращение жгутика обеспечивается молекулярным мотором, способным переключать направление вращения (Рис. 7.3.). Источником энергии для работы мотора служит трансмембранный протонный градиент. Моторно-переключательный комплекс крепится на цитоплазматической стороне MS кольца и образует колоколообразную структуру, известную как С-кольцо. Этот комплекс содержит три белка (FliG, FliM и FliN), участвующие в генерации вращательного момента и переключении направления вращения. Считается, что этот комплекс вращается вместе с MS кольцом, осью, крюком и нитью. Статор мотора сделан из двух белков, окружающих MS кольцо. Карбоксиконцевой домен одного из этих белков, MotB, закреплен в клеточной стенке, а четыре гидрофобных спирали MotA взаимодействуют с аминоконцевой мембранной α -спиралью, образуя проводящий протоны канал через цитоплазматическую мембрану. Предполагается, что до восьми независимых комплексов Mot белков взаимодействуют с моторно-переключательным комплексом, генерируя вращение в ответ на перемещение протонов внутрь клетки. Взаимодействие между ротором и статором обеспечивается рядом разноименно заряженных АК остатков в белках FliG (ротор) и MotA (статор)

Регуляция синтеза жгутикового аппарата

Более 40 генов, кодирующих белки, необходимые для биосинтеза жгутиков, организованы в несколько оперонов. Естественно, что экспрессия такого количества генов находится под строгим контролем. Контроль в данном случае организован иерархически. На вершине иерархии находится *flhDC* оперон, кодирующий два белка, из которых собирается гетеротетрамёрный активатор транскрипции генов второго "уровня". Многие глобальные регуляторы, такие, например, как БАК, DnaA, связанный с нуклеотидом белок H-NS, влияют на уровень экспрессии оперона *flhDC* и, следовательно, на образование жгутиков. Транскрипция генов первых двух уровней обеспечивается РНК-полимеразой с основным сигма-фактором (RpoD). Продуктами генов второго

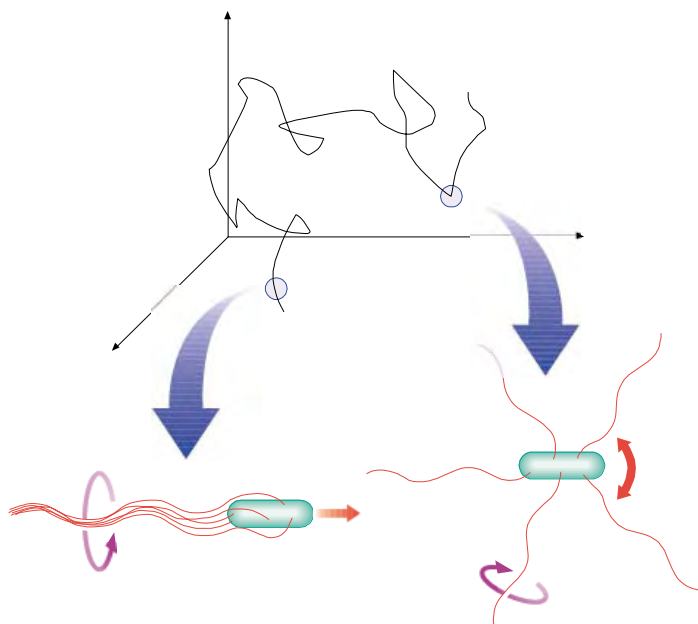


Рис. 7.1. Движение *E. coli*

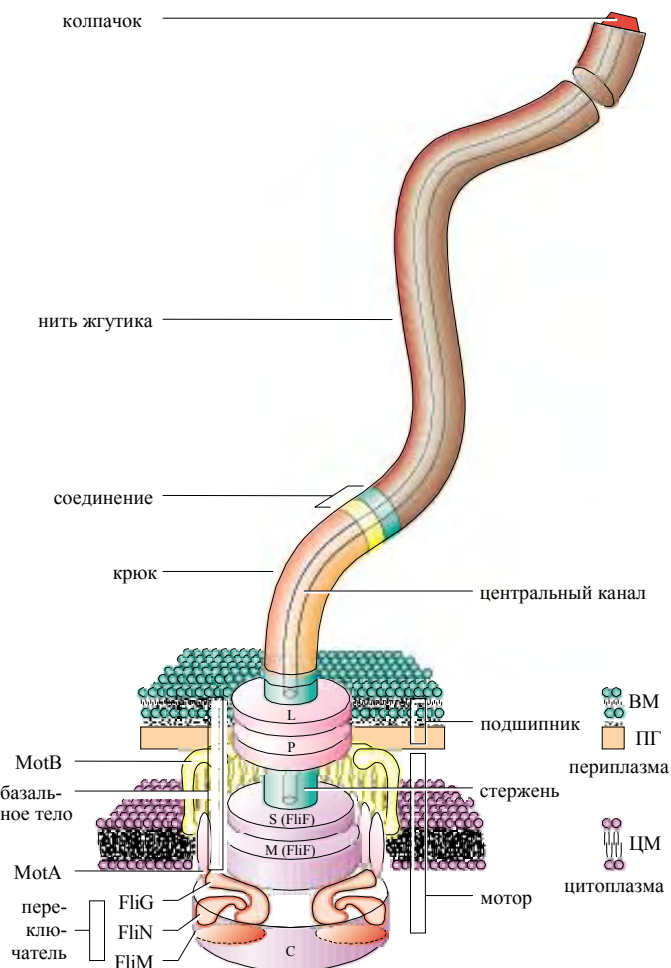
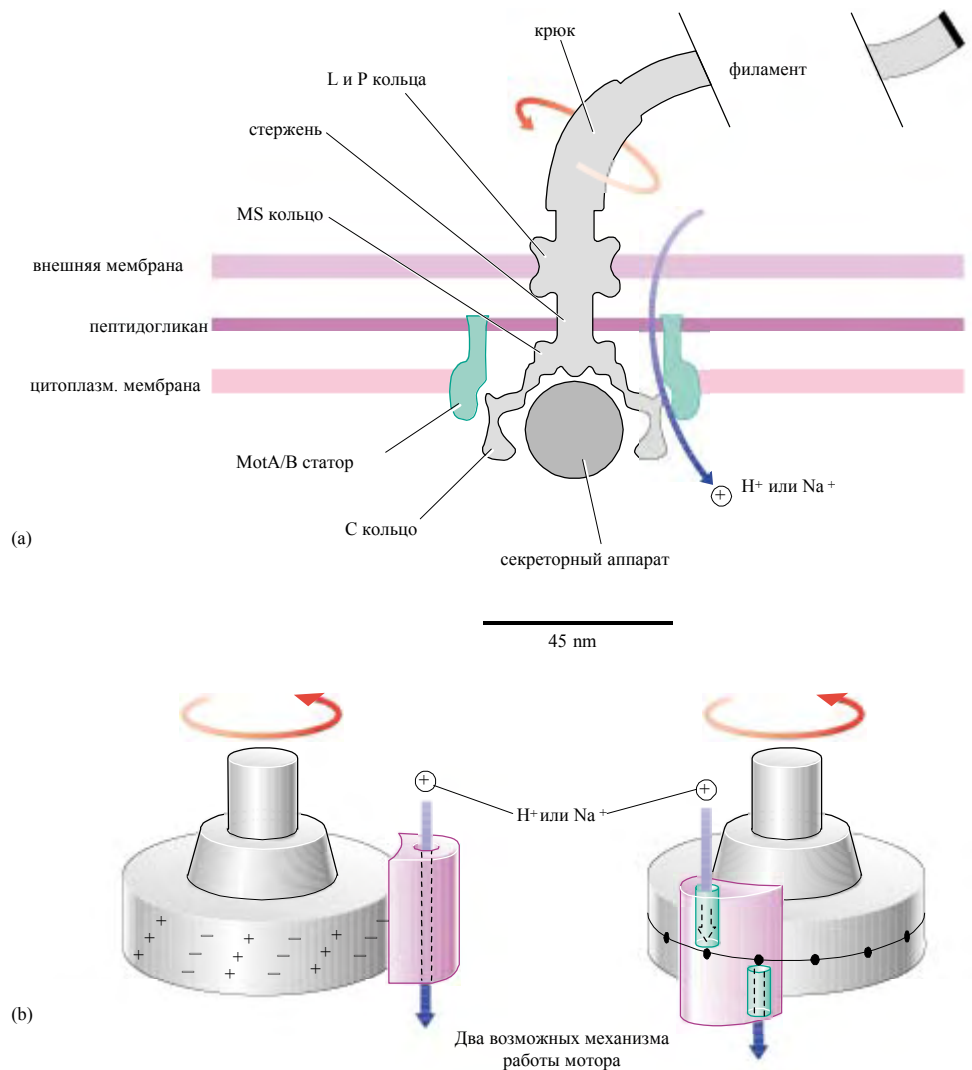


Рис. 7.2. Строение бактериального жгутика
ВМ – внешняя мембрана ПГ – пептидогликан
ЦМ – цитоплазматическая мембрана L, P, S, M, C – кольца базального тела жгутика (видимые в электронном микроскопе)

уровня являются белки, входящие в состав базального тела жгутика и крюка, а также регуляторные белки FlgM и FliA. FliA кодирует альтернативный сигма-фактор σ^{28} или σ^F , необходимый для экспрессии генов третьего, и последнего, уровня, а FlgM является анти-сигма фактором, ингибирующим активность FliA. Когда секреторный аппарат (базальное тело жгутика) и крюк собираются, FlgM экспортируется из клетки и освобождает FliA, который наконец может активировать поздние гены жгутика.



7.2 Что такое хемотаксис и как он реализован у бактерий?

Хемотаксис - способность бактерий двигаться по направлению к аттрактантам (зачастую питательным веществам) и от репеллентов (например, токсинов). В качестве аттрактантов выступают практически все сахара и аминокислоты, в качестве репеллентов - жирные кислоты, спирты и другие потенциально вредоносные вещества.

Чувствительность бактерий впечатляет - они легко детектируют изменение концентрации на 0.1% при микромолярных концентрациях веществ, а диапазон детектируемых концентраций перекрывает пять порядков. Аттрактанты и репелленты детектируются за счет непосредственного взаимодействия со специфическими хеморецепторами, а не за счет каких-либо внутриклеточных эффектов детектируемого вещества. Мембранные рецепторы группируются в кластеры, как правило расположенные на полюсах клетки, однако это не может помочь бактерии уловить разницу концентраций между полюсами, поскольку она будет слишком маленькой из-за малого размера самой клетки. Вместо этого бактерии ориентируются в химических градиентах путем измерения временных изменений концентраций при движении. Обычно скорость движения эшерихии составляет 10-20 своих длин в секунду. Сравнивая текущую загруженность хеморецепторов специфическими лигандами с таковой несколько секунд назад, клетка фактически может "измерить" разницу концентраций определенного вещества на расстоянии, во много раз превышающем длину самой клетки. Такое измерение концентрации лиганда во времени возможно за счет адаптивного метилирования хеморецепторов, которое зависит от загруженности их лигандами. Задержка во времени между связыванием лиганда и метилированием рецептора представляет собой своеобразную молекулярную "память", которая и позволяет измерять изменение концентраций лиганда. Если выбранное направление движения соответствует увеличению концентрации аттрактанта (снижению концентрации репеллента), время до следующего кувыркания увеличивается. К сожалению, из-за своего малого размера клетка постоянно сбивается с "верного" пути броуновским движением и поэтому просто не может продолжительно двигаться прямо. Такой механизм поэтому только в общем обеспечивает движение

Рис. 7.3. Работа мотора жгутика

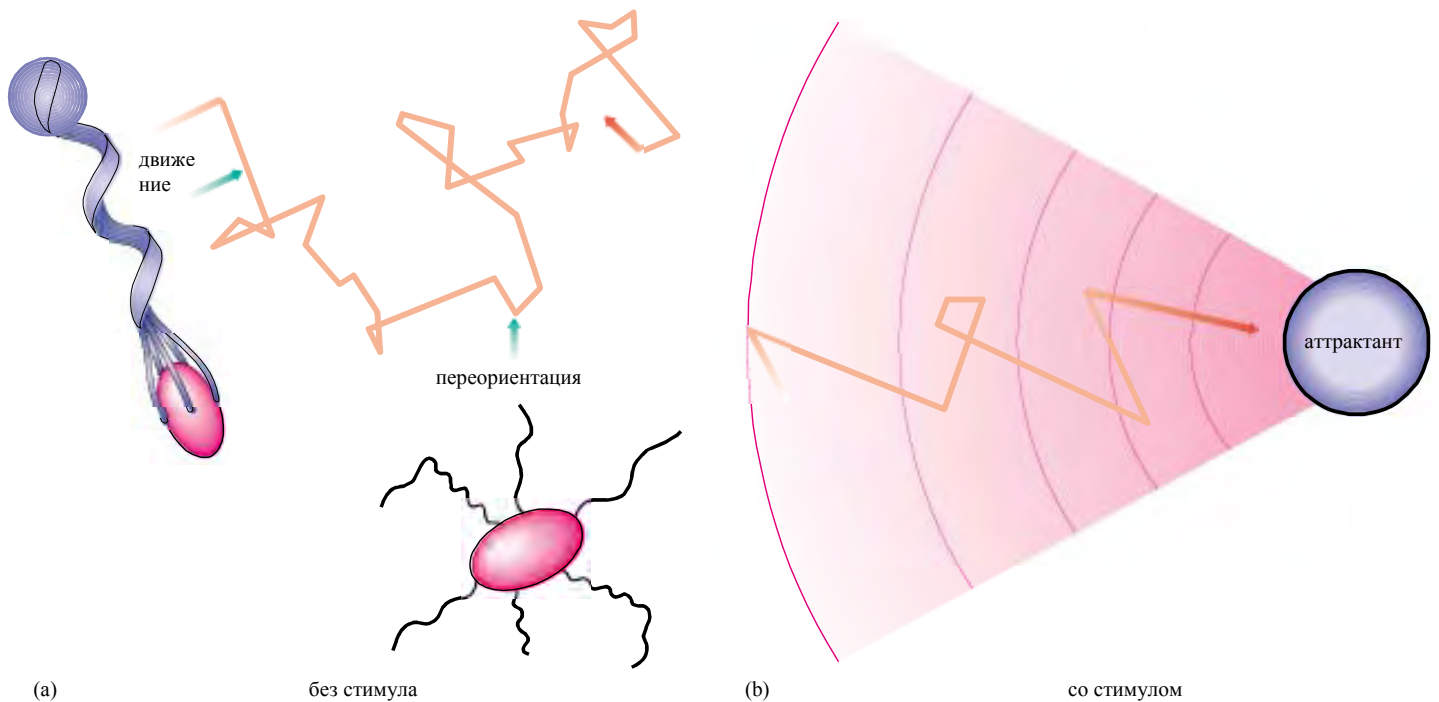


Рис. 7.4. Движение *E.coli* по градиенту аттрактанта за счет контроля продолжительности вращения жгутиков в одном направлении

бактерии по градиенту концентрации в нужном направлении, но для бактерий является достаточно эффективным (Рис. 7.4).

Механизм, основанный на переключении направления вращения жгутиков, приводящий к прямолинейному движению, которое через варьирующие промежутки времени сменяется кувырканием на месте, не является единственным. У *Rhodobacter sphaeroides* вращение единственного жгутика сменяется его полной остановкой, а у *Rhizobium meliloti* вращение жгутика никогда не прекращается – изменяется только его скорость. Но во всех этих случаях результат работы сенсорной системы хемотаксиса один и тот же – если бактерия движется в "нужном" направлении, продолжительность такого движения увеличивается.

Сенсорный механизм хемотаксиса более сложен, чем рассмотренные нами ранее. Это объясняется прежде всего двумя причинами. Во-первых, поскольку броуновское движение может очень быстро изменить ориентацию бактериальной клетки, клетки должны обрабатывать хемотаксические сигналы очень быстро, и, действительно, от стимула до переключения "моторов" у клетки проходит не более 0.2 секунды. Во-вторых, для правильного сравнения пространственных градиентов клеткам необходимо такое устройство сенсорного механизма, которое "гасило" бы сенсорную стимуляцию в статических условиях, т.е. в отсутствии градиента концентрации, как бы много какого-то аттрактанта или репеллента ни присутствовало бы в среде.

7.3 Белковый аппарат хемотаксиса

Три класса белков участвуют в хемотаксисе: трансмембранные рецепторы, цитоплазматические сигнальные белки и ферменты адаптивного метилирования.

Рецепторы хемотаксиса

Многие бактерии детектируют хемотаксические стимулы при помощи рецепторов, известных как метилируемые белки хемотаксиса (methyl-accepting chemotaxis proteins, MCPs). Эти белки являются мембранными сенсорами, в принципе аналогичными по своей структуре EnvZ, с тем только отличием, что цитоплазматический сигнальный домен не является автокиназой. Функцию автокиназы выполняет другой белок - CheA, а сигнальные домены MCP обеспечивают взаимодействие с CheA. Еще одно отличие от типичного сенсора - по обе стороны сигнального домена располагаются сайты метилирования, необходимые для адаптации рецепторов. MCP белки состоят из ок. 550 а.к., и явл. димерами. Хорошо изучены 4 MCP из *E. coli*, реагирующие на серин (Tsr), аспартат и мальтозу (Tar), рибозу, глюкозу и галактозу (Trg) и дипептиды (Tap). У сальмонелл нет Tap, но есть сенсор цитрата

Тер. Серин, аспартат и цитрат связываются непосредственно с рецепторами, тогда как сахара и дипептиды сначала связываются с соответствующими периплазматическими белками, а уже эти комплексы взаимодействуют с рецепторами. Кроме того, МСР реагируют на изменения температуры и pH, а также являются рецепторами для различных репеллентов.

Классический рецептор состоит из

- аминоконцевой трансмембранной спирали,
- периплазматического собственно сенсорного домена, сложенного из четырех α -спиральных участков,
- второй трансмембранной спирали
- большого цитоплазматического сигнального и адаптационного домена.

(Aer – сенсор аэротаксиса: типичный для МСР цитоплазматический домен, но совершенно другая сенсорная часть, содержащая FAD и похожая на NifL)

Цитоплазматические домены сенсоров содержат 4 или 5 остатков глутамата, доступных для метилирования.

Как внеклеточный стимул транслируется во внутриклеточный сигнал?

Две модели

Принцип ножниц:

Связывание лиганда дистальными концами связанных с мембраной спиралей может индуцировать значительное перемещение трансмембранных сегментов (принцип ножниц). В несвязанном с лигандом состоянии субъединицы рецептора предположительно взаимодействуют между собой только в области первого трансмембранного сегмента. Связывание с лигандом вызывает сближение сенсорных периплазматических субъединиц, что передается сигнальным субъединицам и обеспечивает их взаимодействие между собой, а в таком виде они уже не могут взаимодействовать с CheA и стимулировать его автокиназную активность. Метилирование создает стерические препятствия для взаимодействия сигнальных доменов между собой, что снова позволяет им стимулировать автокиназную активность CheA.

Принцип пистона:

Сейчас все больше и больше данных накапливается в пользу другого механизма, основанного на скольжении трансмембранных сегментов (ТМ) друг относительно друга. Самый аминоконцевой ТМ1 закреплен в мембране жестко, тогда как второй более подвижен, и при связывании лиганда скользит "вниз", т.е. в

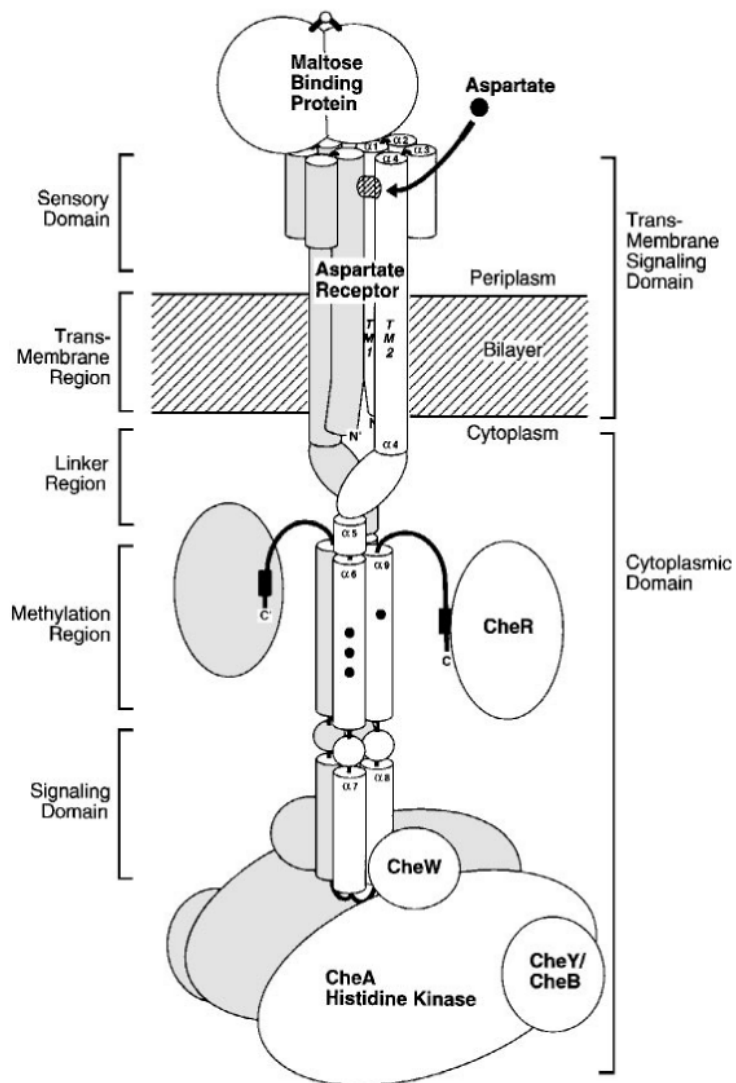


Рис. 7.5. Рецептор хемотаксиса Tar

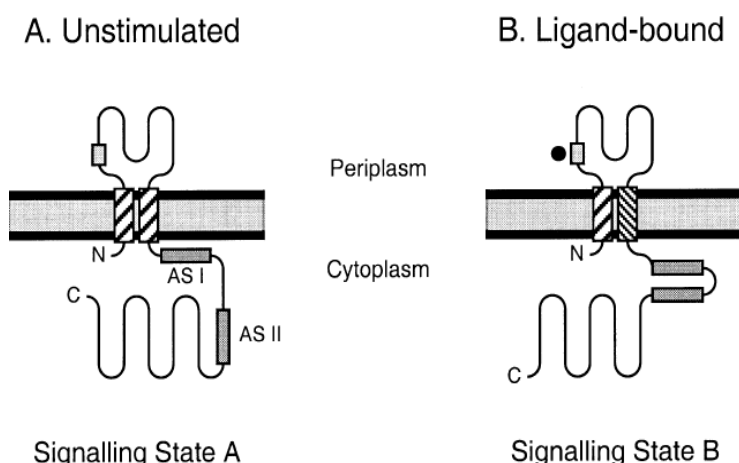


Рис. 7.6. Модель трансмембранной передачи сигнала от сенсорного к сигнальному домену рецептора

сторону цитоплазмы, что и вызывает конформационное изменение цитоплазматического сигнального домена, инактивирующее его. Вариация на эту тему – участие двух амфипатических спиралей линкерного домена в изменении конформации (Рис. 7.6).

Цитоплазматические сигнальные белки и регуляторный механизм хемотаксиса

Взаимодействие между рецепторами и переключателем жгутика осуществляется четырьмя белками (Рис. 7.7):

- ◆ CheA - ГК
- ◆ CheY - PO
- ◆ CheW - "адаптор" между рецептором и CheA
- ◆ CheZ - белок, способствующий дефосфорилированию CheY~Ф

Пара белков CheA-CheY представляет собой двухкомпонентную регуляторную систему, которая несколько отличается от рассмотренных ранее "классических" примеров. Наиболее существенным отличием является то, что CheY не является транскрипционным фактором и, соответственно, у него отсутствует ДНК-связывающий домен. ГК CheA функционирует в виде димера, с которым связываются два мономера CheW, и уже этот комплекс вступает в ассоциацию с димерным рецептором. В составе такого комплекса автокиназная активность резко возрастает, что усиливает перенос фосфата от CheA~Ф к CheY. CheY~Ф связывается с FliM моторно-переключательного комплекса базального тела, что приводит к вращению жгутика по часовой стрелке. CheZ предотвращает накопление CheY~Ф, стимулируя автофосфатазную активность CheY.

При отсутствии аттрактанта концентрация CheY~Ф поддерживается на уровне, способствующем вращению жгутика преимущественно по часовой стрелке и, следовательно, отсутствию упорядоченного движения бактерии. Связывание аттрактанта с рецептором индуцирует конформационное изменение, которое передается четез мембрану и подавляет автокиназную активность CheA. Концентрация CheY~Ф падает, и жгутики бактерии более продолжительное время вращаются против часовой стрелки. Поэтому клетки будут дольше двигаться прямолинейно, если они попадают в среду с более высокой концентрацией аттрактанта. Однако этот механизм не объясняет, как клетка может реагировать на постоянно возрастающую концентрацию аттрактанта. Этой цели служит сенсорная адаптация.

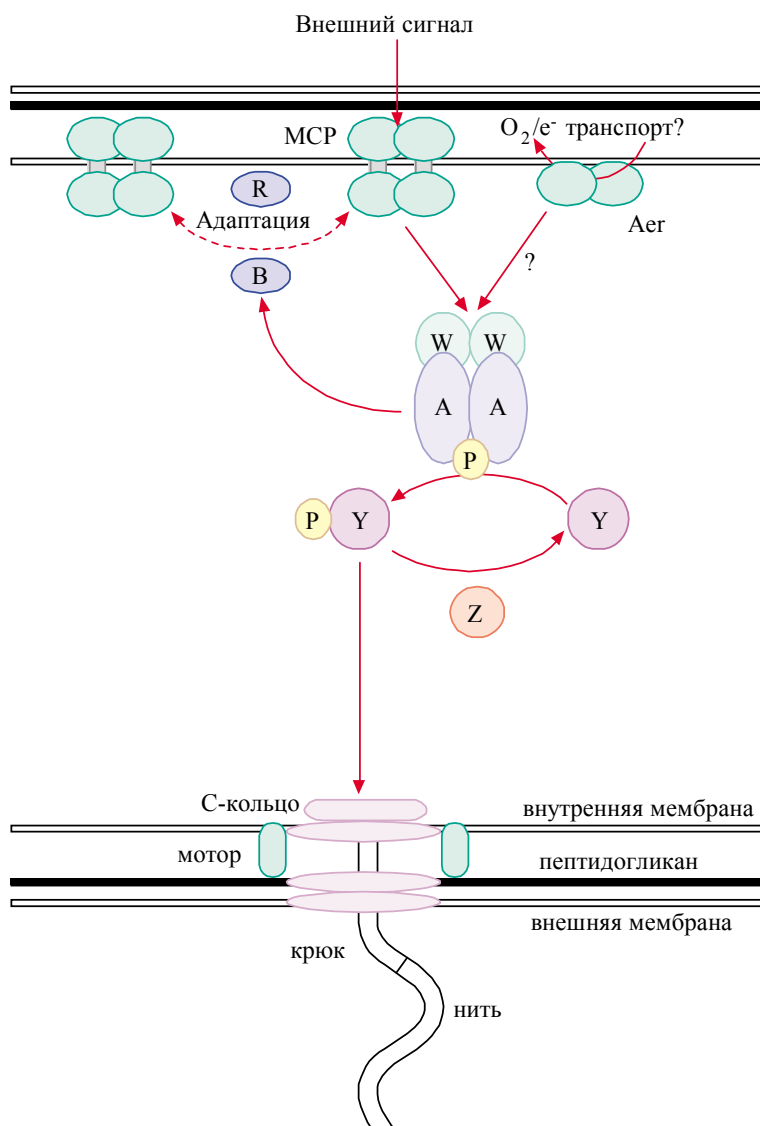


Рис. 7.7. Молекулярный механизм хемотаксиса

Метилазы хемотаксиса и сенсорная адаптация.

Адаптация сенсорного аппарата достигается путем обратимого метилирования рецепторов, в котором участвуют два белка – метилтрансфераза CheR и метилэстераза CheB. Метилирование рецепторов оказывает действие, противоположное связыванию аттрактанта. Интересно, что

метилование стимулируется связыванием аттрактанта с рецептором и в конечном итоге нейтрализует эффект связывания аттрактанта. Однако между связыванием аттрактанта и метилированием рецептора проходит некоторое время, в течение которого бактерии движутся прямолинейно, что и составляет основу молекулярной памяти машины хемотаксиса.

CheR - метилтрансфераза, метилирующая остатки глутамата в цитоплазматических доменах MCP с постоянной скоростью, перенося метил-группу с S-аденозилметионина.

CheB является мишенью для переноса фосфата с CheA~Ф, и CheB~Ф является метилэстеразой, деметилирующей MCP.

В отсутствие стимула метилирование MCP, осуществляемое CheR, компенсируется удалением метильных групп фосфорилированным CheB, что поддерживает метилирование MCP на уровне 0.5-1 метильная группа на субъединицу рецептора.

Когда аттрактант связывается с рецептором и ингибирует активность CheA, концентрация CheB~Ф падает, хотя и более медленно, чем концентрация CheY~Ф, поскольку CheB~Ф не является субстратом для CheZ. Повышение степени метилирования восстанавливает способность рецептора стимулировать CheA. Однако, даже после того как базальные уровни CheY~Ф и CheB~Ф восстанавливаются, связанный с аттрактантом рецептор остается метилированным, поскольку метилированный рецептор – более плохой субстрат для метилэстеразы CheB~Ф.

Таким образом, с учетом метилирования принцип работы молекулярной машины хемотаксиса выглядит следующим образом.

- В отсутствие аттрактанта хеморецептор находится в активированном состоянии и его сигнальный домен активирует киназную активность CheA, что ведет к фосфорилированию CheY, а фосфо-CheY, взаимодействуя с переключателем мотора, вызывает вращение жгутика по часовой стрелке, что вызывает кувыркание бактерии на месте.
- Связывание аттрактанта инактивирует рецептор, и его сигнальный домен уже не может стимулировать киназную активность CheA, концентрация фосфо-CheY быстро падает (что стимулируется белком CheZ), направление вращения жгутика меняется и бактерия движется прямолинейно.
- Прямолинейное движение, однако, может прекратиться по двум причинам. Если бактерия начала двигаться в неблагоприятном направлении, рецептор освобождается, начинается фосфорилирование CheY, и бактерия снова кувыркается на месте. Кроме того, когда киназа CheA "выключена", одновременно с дефосфорилированием CheY~Ф происходит дефосфорилирование CheB~Ф, хотя и с меньшей скоростью (поскольку CheB~Ф не является субстратом для CheZ), что приводит к повышению степени метилирования рецептора и восстановлению его сигнальной активности.

Поскольку и CheY, и CheB являются свободными цитоплазматическими белками, степень их фосфорилирования будет зависеть от степени метилирования рецепторов и их загруженности лигандами. Это делает возможным вместо ответа "все или ничего" плавно регулировать подвижность бактерий в широком диапазоне концентраций аттрактантов и репеллентов.

Метилирование рецепторов обеспечивает простейшую молекулярную память, позволяющую бактерии контролировать "правильность" направления движения. Уровень метилирования будет высоким, если концентрация аттрактанта была высокой некоторое время назад. Когда клетка движется, она "сравнивает" сиюмоментную концентрацию аттрактанта (определяемую по степени занятости рецепторов) с концентрацией в недавнем прошлом (как зафиксировано степенью метилирования рецепторов). Если окружающие условия значительно улучшились или ухудшились, активность гистидинкиназы CheA будет соответственно снижена или повышена, изменяя продолжительность прямолинейного движения соответствующим образом.

Литература:

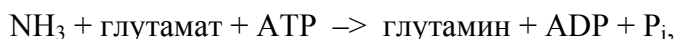
1. M.D. Manson, J.P. Armitage, J.A. Hoch, R.M. Macnab. Bacterial locomotion and signal transduction. J. Bacteriol 1998. 180:1009-1022
-

8. Утилизация азота

Бактерии могут использовать множество азотсодержащих соединений в качестве источника клеточного азота - от простейших неорганических (азот, нитрат) до сложных соединений включая аминокислоты и нуклеозиды.

Аммиак является наиболее предпочтительным источником азота практически для всех бактерий. Однако бактериям чаще приходится утилизировать альтернативные источники азота, для чего они синтезируют множество белков, необходимых для транспорта внутрь клетки и последующего метаболизма азотсодержащих соединений. Синтез, а в некоторых случаях и активность, этих белков строго контролируются в соответствии с доступностью субстратов.

Практически у всех бактерий глутамат и глутамин служат как основные доноры азота в биосинтетических реакциях. За образование этих аминокислот практически у всех бактерий отвечают два фермента. Первый, глутамин синтетаза, продуцирует глутамин из глутамата и аммиака:



тогда как второй, глутамат синтетаза, переносит аминогруппу с глутамина на 2-кетоглутарат с образованием двух молекул глутамата:



Суммарным результатом этих двух реакций является продукция глутамата из аммиака и 2-кетоглутарата. Эти реакции катализируются двумя ферментами:

Глутаминсинтетаза (GlnA). Додекамерный фермент, состоящий из 12 идентичных субъединиц размером 55 кДа. Субъединицы организованы в два шестичленных кольца, лежащих друг на друге и сдерживаемых гидрофобными взаимодействиями и водородными связями. Активность фермента регулируется путем аденилирования (которое инактивирует фермент). Аденилирование происходит в ответ на увеличение внутриклеточной концентрации аммония - чем выше его концентрация, тем больше субъединиц GlnA инактивировано. Этот процесс катализируется аденилилтрансферазой (GlnE), основной функцией которой является преодоление последствий "аммонийного шока", происходящего при попадании бактерий из бедной азотом среды в богатую. В этих условиях высокая активность глутаминсинтетазы приводит к переводу практически всего глутамата в глутамин, лишая клетку необходимой аминокислоты. Аденилилтрансфераза, быстро инактивируя глутаминсинтетазу при повышении внутриклеточной концентрации аммония, предотвращает это явление.

Глутаматсинтетаза - гетеродимер, субъединицы которого кодируются генами *gltBD*. Синтез глутаматсинтетазы находится под контролем Lrp (leucine-responsive regulatory protein), что приводит к репрессии синтеза фермента в богатой среде.

Биохимические и генетические механизмы контроля утилизации азота наиболее изучены у представителей семейства Enterobacteriaceae. У этих бактерий система регуляции метаболизма азота (Рис. 8.1) кодируется четырьмя генами:

glnD, кодирующим уридилтрансферазу/деуридилазу (UTase/UR),

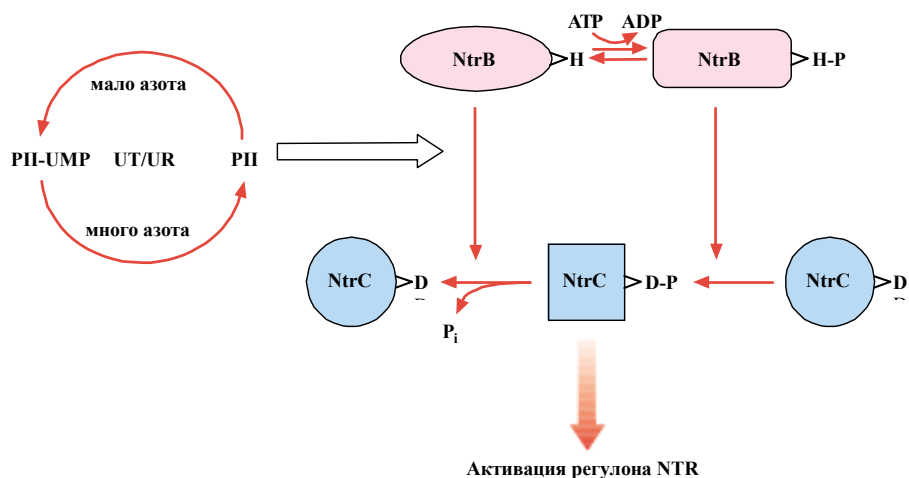


Рис. 8.1. Регуляция азотного метаболизма белками NtrB и NtrC

glnB, кодирующим малый регуляторный белок P_{II},
ntrB, кодирующим гистидинкиназу, и
ntrC, кодирующим регулятор ответа - транскрипционный энхансер.

Белок **NtrB** (продукт гена *glnL*) является типичной сенсор-киназой, однако, будучи цитоплазматическим, не имеет мембранного якоря. Цитоплазматическим сигналом, детектируемым NtrB, является белок P_{II}, который в уридилированной форме сигнализирует о недостатке, а в немодифицированной форме - об избытке азота.

При нехватке азота NtrB катализирует фосфорилирование и, следовательно, активацию регулятора ответа NtrC. N-концевой домен NtrB является сенсором, взаимодействующим с белком P_{II}, а С-концевой домен обладает автокиназной активностью, фосфорилируя аминокислотный остаток His-139. Кроме того, NtrB обладает еще и фосфатазной активностью и может дефосфорилировать NtrC, что зависит от присутствия немодифицированного P_{II}. Именно фосфатазная, а не киназная активность подвержена регуляции в данном случае – повышение внутриклеточной концентрации глутамина ведет к усилению фосфатазной активности NtrB.

NtrC (продукт гена *glnG*) - димерный (как и NtrB) белок с массой субъединицы 55 кДа. Этот белок является типичным примером σ^{54} -зависимых активаторов и имеет три четко выраженных домена. N-концевой домен является "приемником", и именно здесь расположен остаток аспартата, фосфорилируемый при взаимодействии с NtrB (Asp-54). Только фосфорилированная по Asp-54 форма белка способна активировать транскрипцию. Фосфорилирование NtrC стимулирует взаимодействие с ДНК, но не непосредственно связывание, а олигомеризацию димеров NtrC на активаторных последовательностях. Центральный домен NtrC типичен для σ^N -зависимых активаторных белков, и именно этот домен взаимодействует с σ^N -содержащей РНК-полимеразой ($E\sigma^N$). Домен содержит АТФ-связывающий сайт и обладает АТФазной активностью, необходимой для формирования открытого комплекса с $E\sigma^N$. Эта АТФазная активность стимулируется связыванием с ДНК и фосфорилированием по Asp-54. Связывание NtrC с ДНК обеспечивается С-концевым доменом, который содержит типичный мотив "спираль-поворот-спираль" (такую структуру мы уже рассматривали на примере репрессора фага λ). Этот мотив позволяет NtrC связываться с активаторными последовательностями - энхансерами, обычно расположенными на расстоянии около 100 н.п. перед промоторными последовательностями, с которыми связывается $E\sigma^N$. Функцией энхансера является способствование олигомеризации димеров NtrC, необходимой для активации транскрипции. NtrC может также выступать и в роли репрессора, если сайты его связывания перекрываются с промотором.

У кишечных бактерий подвержены регуляции через NtrC многие гены - *glnA ntrBC*; гены, кодирующие транспорт глутамина (*glnHPQ*), аргинина (*argT*) и гистидина (*hisJQMP*); гены, необходимые для ассимиляции нитрита и нитрата (*nasFEDCBA*); регуляторные гены фиксации азота *nifLA* у *K. pneumoniae* и *nac* у *K. aerogenes*.

Уридилтрансфераза (GlnD). Этот белок отвечает как за присоединение уридинмонофосфата к P_{II} (GlnB), так и за его отсоединение. Количество внутриклеточного азота отражается на соотношении концентраций глутамина и 2-кетоглутарата (высокое при избытке и низкое при недостатке азота), что влияет на активность уридилтрансферазы. Активность этого фермента стимулируется 2-кетоглутаратом и АТФ и ингибируется глутамином. Следовательно, степень уридилрования P_{II} (GlnB) зависит от соотношения концентраций глутамина и 2-кетоглутарата.

P_{II} (GlnB). Тримерный белок, способный связывать АТФ, 2-кетоглутарат и глутамат. Связывание P_{II} с NtrB стимулирует фосфатазную активность NtrB по отношению к NtrC. Для такой стимуляции NtrB необходимо связать АТФ и 2-кетоглутарат либо глутамат. В условиях азотного голодания 2-кетоглутарат индуцирует конформационное изменение P_{II}, способствующее его уридилрованию. В условиях же избытка азота уридилтрансфераза связывает глутамин, что блокирует уридилрование и, наоборот, способствует деуридилрованию P_{II}. Уридилрованная форма P_{II} неспособна связываться с NtrB. Неуридилрованная форма взаимодействует не только с NtrB, но и с аденилилтрансферазой, стимулируя ее активность, что ингибирует глутаминсинтетазу.

NtrC в первую очередь активирует RpoN-зависимый промотор оперона *glnALG* (гены которого кодируют два регуляторных белка и глутаминсинтетазу). увеличение синтеза регуляторных белков

приводит к увеличению внутриклеточной концентрации NtrC-P, что активирует многие RpoN-зависимые гены. Одним из таких генов является *nac*, необходимый для активации транскрипции ряда генов азотного метаболизма, имеющих σ^{70} -зависимые промоторы.

Литература:

1. M. Buck, M. A. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo, And J. D. Gralla. The Bacterial Enhancer-Dependent σ^{54} (σ^N) Transcription Factor. J. Bacteriol. 2000, p. 4129–4136 Vol. 182, No. 15
2. D.J. Studholme, M. Buck. The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in bacteria: insights from genome sequences. FEMS Microbiol. Lett. 186 (2000) 1-9

9. Кислородный стресс и редокс контроль.

Метаболизм клеток существенно различается в аэробных и анаэробных условиях. В аэробных условиях клетка может получить гораздо больше энергии, но это не дается ей бесплатно – кислород окисляет не только источники энергии, но и многие жизненно важные клеточные компоненты. Поэтому в аэробных условиях в клетке при помощи регуляторов OxyR и SoxR индуцируются белки, защищающие ее от кислорода, такие как супероксиддисмутаза и каталаза. С другой стороны, клетка вынуждена существенно перестраивать свой метаболизм если она попадает в бедные энергией анаэробные условия – теперь она уже не может себе позволить многие "роскоши". Такая метаболическая перестройка контролируется регуляторными белками – гистидиновой сенсорной киназой ArcB и регулятором транскрипции FNR. Эти два белка контролируют такие разнообразные процессы, как дыхание и фотосинтез, утилизация углерода и азота. Эти два регулятора реагируют на разные концентрации кислорода, позволяя точно подстраивать контроль различных генов к условиям полного или частичного анаэробноза.

Активные радикалы: их повреждающее действие и механизм инактивации

Кислородный стресс вызван действием активных кислородных интермедиатов, таких как анион супероксида ($O_2^{\bullet-}$), перекись водорода H_2O_2 и гидроксил-радикал HO^{\bullet} , которые способны повреждать белки, нуклеиновые кислоты и клеточные мембраны (Рис.9.1). Кроме того, повреждающее действие на клеточные структуры имеют производные этих активных соединений гипохлорная кислота ($HOCl$) и активные азотные интермедиаты - азотистый оксид (NO^{\bullet}), пероксинитрит ($HOONO$) и нитрозотиолы ($RSNO$). Для предотвращения повреждений клетка вынуждена постоянно синтезировать ферменты, инактивирующие активные радикалы и устраняющие вызванные ими повреждения.

Причина окислительного стресса.

Окислительный стресс является неизбежным побочным продуктом аэробного стиля жизни, поскольку $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 формируются каждый раз, когда молекулярный кислород химически окисляет переносчики электронов. Особенно активны в этом отношении восстановленные флавопротеины. У экспоненциально растущих бактерий *E. coli* $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 образуются при автоокислении компонентов дыхательной цепи. Флавин NADH дегидрогеназы II является основным местом переноса электронов к кислороду. Фумаратредуктаза - терминальная оксидаза, индуцируемая при анаэробном росте, - очень активно взаимодействует с кислородом и, возможно, является основной причиной стресса, возникающего при переходе от анаэробных к аэробным условиям. Растущие в

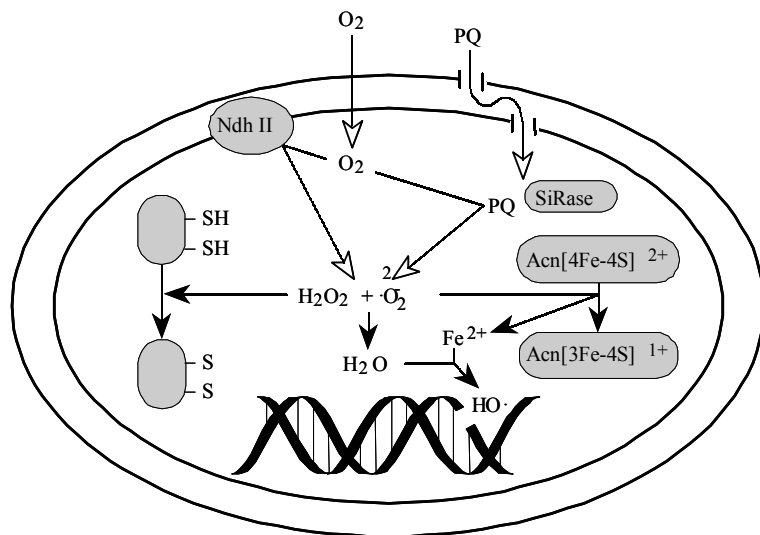


Рис.9.1. Повреждение макромолекул клетки активными формами кислорода

аэробных условиях *E. coli* производят достаточно супероксиддисмутазы, чтобы поддерживать концентрацию $O_2^{\bullet-}$ на уровне порядка 10^{-10} М. Это около половины той концентрации, которая могла бы уменьшить активность жизненно важных ферментов и ингибировать рост. Концентрация H_2O_2 на порядок меньше ингибирующей. Таким образом, защитные системы бактериальной клетки поддерживают концентрацию активных производных кислорода на уровне, лишь слегка более низком, чем токсичный. Это активно используется растениями, животными, а иногда и другими бактериями для защиты от своих бактериальных конкурентов (или патогенов). Например, фагоциты животных используют NADPH оксидазу, NO• синтазу и миелопероксидазу для того, чтобы бомбардировать захваченные бактерии $O_2^{\bullet-}$, NO•, HOCl и их производными H_2O_2 , HOONO и RSNO

Механизмы окислительных повреждений клетки.

Наиболее чувствительными к окислительным повреждениям являются различные дегидратазы, использующие железо-серные кластеры [4Fe-4S] для связывания и дегидрирования субстратов. Окисление таких дегидратаз супероксид-ионом вызывает разрушение Fe-S кластеров и потерю активности. Кроме того, побочным продуктом такого окисления являются многочисленные ионы железа, высвобождаемые в цитоплазму, где они совместно с H_2O_2 катализируют окисление ДНК.

H_2O_2 эффективно окисляет тиолы, поэтому повреждает множество дегидрогеназ, использующих остатки цистеина в каталитическом центре. Кроме того, взаимодействие H_2O_2 с ионами Fe^{2+} дает сильнейший окислитель HO• (гидроксил), способный взаимодействовать практически со всеми биомолекулами, в первую очередь с ДНК, с чем и связана в первую очередь летальность действия H_2O_2 .

(действие активных форм азота)

Защита от окислительного стресса.

Для защиты от окислительного стресса клетка использует целый ряд антиоксидантных ферментов и систем репарации, большинство которых экспрессируется на низком базальном уровне в нормальных условиях. При воздействии супероксида и перекиси водорода экспрессия многих антиоксидантных белков индуцируется, что зависит в основном от действия двух регуляторов - SoxRS и OxyR.

SoxRS регулон

SoxRS в ответ на супероксид регулирует экспрессию не менее 10 белков, включая супероксиддисмутазу (SodA), участвующую в репарации ДНК эндонуклеазу IV (Nfo) и резистентные к супероксиду изоформы фумаразы (FumC) и аконитазы (AcpA). Аконитаза конвертирует цитрат в изоцитрат в цикле Кребса. Это мономер с одним железо-серным центром, который может находиться в каталитически активной [4Fe-4S] и неактивной (например, из-за окислительного повреждения) [3Fe-4S] форме. Кроме того, SoxRS обеспечивает увеличение концентрации глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Zwf), что усиливает восстановительную силу клетки, и увеличение количества репрессора метаболизма железа Fur, что снижает поглощение железа и, следовательно, снижает выработку гидроксила.

Индукция регулона происходит в два этапа. Сначала редокс-сенсорный белок SoxR под влиянием супероксид-иона индуцирует транскрипцию *soxS*, а затем уже SoxS непосредственно активирует гены-мишени, связываясь с их промоторными областями. Конститутивно экспрессируемый белок SoxR (Рис. 9.2) - димер, каждая из субъединиц которого содержит по одному стабильному [2Fe-2S] центру. Окисление восстановленной формы $[2Fe-2S]^+$ в форму $[2Fe-2S]^{2+}$ приводит к активации SoxR. Какая молекула вызывает окисление SoxR, пока неясно. Возможно, это делает сам супероксид-ион.

Только окисленная форма SoxR может активировать транскрипцию *soxS*, однако восстановленная SoxR форма обладает той же аффинностью к ДНК. Следовательно, окисление регулятора должно каким-то образом изменять его взаимодействие с ДНК.

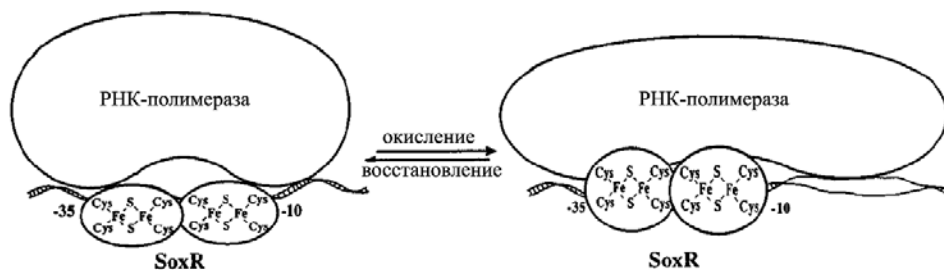


Рис.9.2. Активация транскрипции белком SoxR

Интересным является то, где SoxR связывается с регуляторной областью – между сайтами –10 и –35 промотора, что очень необычно для активатора транскрипции. Кроме того, расстояние между этими сайтами слишком большое для активного промотора – 19 н.п. Скорее всего, промоторная область *soxS* одновременно оказывается занятой РНК-полимеразой и SoxR, расположенными по разные стороны ДНК, а окисление SoxR каким-то образом помогает РНК-полимеразе образовать открытый комплекс на нестандартном промоторе.

Гены *soxS* и *soxR* расположены рядом друг с другом, транскрибируются в противоположные стороны, причем их промоторные области перекрываются.

OxyR регулон

Другой транскрипционный фактор, OxyR, в ответ на H_2O_2 активирует синтез примерно 30 белков (четко показан контроль через OxyR только для 9 из них), в том числе каталазы (гидропероксидазы I, KatG), двух субъединиц алкилгидропероксид редуктазы (AhpCF), глутаредоксина (GtxA), глутатион редуктазы (GorA), Mn-супероксиддисмутаза и Fur-репрессора. Регулируемые OxyR неспецифический ДНК-связывающий белок Dps (DNA-binding protein from starved cells) и регуляторная РНК OxyS защищают от мутагенеза. Активируется также синтез ряда генов теплового шока и регулятора синтеза капсульных полисахаридов.

Ген *oxyR* кодирует небольшой 34 kDa белок, принадлежащий к семейству LysR-подобных регуляторов. Как и большинство регуляторов этого семейства, OxyR негативно контролирует свой собственный синтез, причем как в присутствии H_2O_2 , так и в ее отсутствии. Такая регуляция поддерживает количество белка на постоянном уровне. OxyR также активирует транскрипцию соседнего, транскрибируемого в противоположном направлении, гена *oxyS*, продуктом которого является небольшая нетранслируемая РНК, влияющая на экспрессию целого ряда генов.

Тетрамер OxyR существует в двух формах - окисленной и восстановленной, но только окисленная форма активирует транскрипцию, связываясь с карбоксиконцевым доменом α -субъединицы РНК-полимеразы (Рис. 9.3). H_2O_2 непосредственно окисляет OxyR, приводя к образованию дисульфидной связи между двумя цистеиновыми остатками одной субъединицы OxyR. Образование этой дисульфидной связи вызывает конформационное изменение, которое влияет на связывание с ДНК. Восстановление (и, следовательно, инактивация) OxyR осуществляется глутаредоксином 1 (тиол:дисульфид оксидоредуктазой, использующей восстановленный глутатион и NADH в качестве восстановителей), а поскольку глутаредоксин, также как и глутатионредуктаза, находятся под контролем OxyR, получается, что OxyR сам активирует экспрессию ферментов, необходимых для его восстановления, т.е. инактивации.

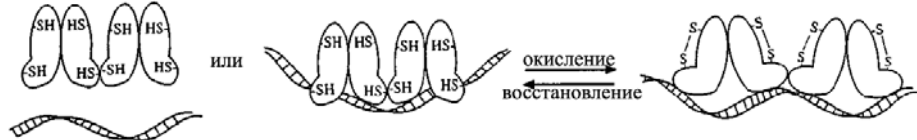


Рис.9.3. Активация транскрипции белком OxyR

Адаптация к анаэробнозю.

Основные регуляторы - FNR (fumarate and nitrate reduction) и ArcA (aerobic respiratory control)

Оба белка являются транскрипционными факторами, активирующимися в анаэробных условиях и инактивирующихся при взаимодействии с кислородом. FNR детектирует кислород непосредственно через редокс-чувствительный Fe-S кластер, входящий в его структуру, тогда как активность ArcA зависит от его фосфорилирования, контролируемого мембранной гистидинкиназой ArcB. В отличие от FNR ArcB не детектирует содержание кислорода непосредственно, а реагирует на общее состояние клетки. В связи с этим два регулятора реагируют на различные концентрации кислорода и контролируют разные, но частично перекрывающиеся наборы генов. Это позволяет бактерии быстро и эффективно приспосабливаться к широкому диапазону концентраций кислорода.

FNR как сенсор кислорода

FNR – глобальный регулятор, контролирующий экспрессию более 120 генов у *E. coli*. Белок был идентифицирован путем изоляции мутантов, неспособных восстанавливать нитрат и фумарат. Позже было показано, что белок отвечает за индукцию в анаэробных условиях таких ферментов цикла Кребса как сукцинат дегидрогеназа, фумараза, изоцитрат дегидрогеназа, участвующих в производстве энергии

путем окислительного фосфорилирования. FNR также активирует экспрессию ферментов анаэробного дыхания, которые используют альтернативные конечные акцепторы электронов, такие как DMSO, фумарат или нитрат. Помимо активации экспрессии необходимых в анаэробных условиях белков FNR также репрессирует такие аэробные респираторные ферменты как цитохромоксидаза и NADH дегидрогеназа.

Интересно то, что по аминокислотной последовательности FNR похож на БАК. Механизм активации транскрипции обеими белками тоже одинаков - оба активируют транскрипцию, контактируя с α -субъединицей РНК-полимеразы. Единственным существенным отличием FNR является дополнительный участок на amino-конце этого белка, несущий ферредоксинаобразный кластер из четырех цистеиновых остатков (Cys-X3-Cys-X2-Cys-X5-Cys), что привело к предположению о детекции кислорода при помощи железо-серных кластеров.

При взаимодействии с кислородом два $[4Fe-4S]^{2+}$ кластера димера FNR быстро (за пару минут) превращаются в два $[2Fe-2S]^{2+}$ кластера, причем железо остается связанным с окисленным FNR, скорее всего в виде сульфида (Рис. 9.4). Если клетку быстро вернуть в анаэробные условия, $[2Fe-2S]^{2+}$ центры быстро возвращаются в исходное $[4Fe-4S]^{2+}$ состояние. Однако более продолжительная инкубация в присутствии кислорода ведет уже к необратимому разрушению центров $[2Fe-2S]^{2+}$, давая апобелок, полностью лишенный железа. FNR активен как транскрипционный фактор только в форме гомодимера,

для образования которого необходимо присутствие интактных $[4Fe-4S]^{2+}$ кластеров. Преобразование кубической структуры $[4Fe-4S]^{2+}$ в плоскую $[2Fe-2S]^{2+}$ при окислении белка в аэробных условиях оказывается достаточным для внесения существенных конформационных изменений, вызывающих диссоциацию димера FNR на мономеры, что предотвращает связывание белка с ДНК.

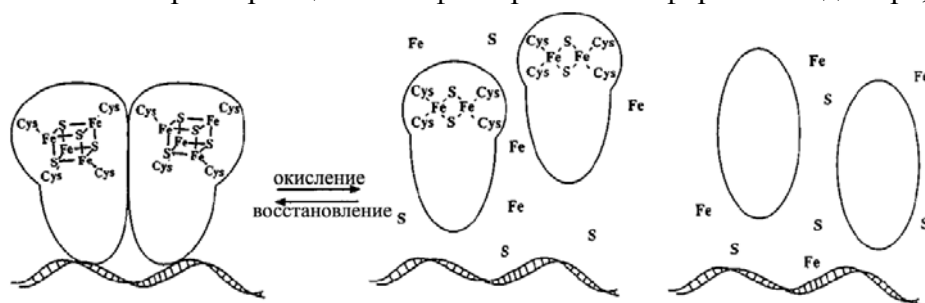


Рис.9.4. Репрессия транскрипции белком FNR

Широкий диапазон концентраций кислорода детектируется клетками *E. coli*.

Анаэробное дыхание у этой бактерии происходит в диапазоне концентраций кислорода 1-5 μM (при наличии соответствующих акцепторов электронов), при более низкой концентрации бактерия переключается на брожение. Именно в этом диапазоне концентраций и происходит переход FNR из неактивной в активную форму.

ArcB

реагирует на изменения концентрации кислорода на границе микроанаэробной и анаэробной зоны (5-10 μM). Этот белок скорее всего реагирует на изменения электронтранспортной цепи (трансмембранного протонного потенциала или же степени окисления какого-то переносчика электронов). Вторым сигналом, на который может реагировать ArcB, является концентрация анаэробных метаболитов.

ArcB работает в паре с PO ArcA (Рис. 9.5). На сегодняшний день регулон ArcA насчитывает более 30 генов, кодирующих ферменты цикла Кребса (флавопротеиновые дегидрогеназы, цитохромоксидазы и т.д.), глиоксилатного шунта и деградации жирных кислот. Регуляция в основном заключается в репрессии при анаэробии синтеза ферментов аэробного дыхания, хотя ArcA также активирует несколько генов в микроанаэробных условиях.

ArcB имеет существенное сходство с компонентами сенсорных систем. В его состав

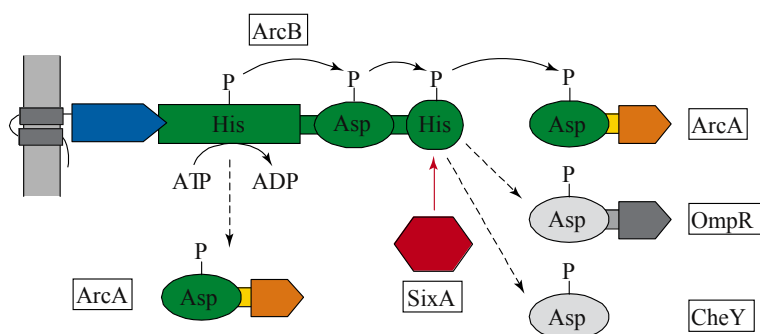


Рис.9.5. Двухкомпонентная регуляторная система ArcA/ArcB

входят: классический гистидинкиназный домен, центральный домен, сходный с регуляторным доменом PO, и небольшой HPt домен на карбокси-конце. Фосфат может передаваться на ArcA с любого из фосфорилированных гистидиновых остатков в составе ArcB – и из автокиназного, и из HPt домена. Причем имеются данные, что для реакции на анаэробные метаболиты достаточно только автокиназного домена, тогда как для "определения" состояния электронтранспортной цепи важен HPt домен.

Аэротаксис

Флавопротеин AerA является мембранным рецептором, отвечающим за аэротаксис. Амино-концевой домен этого белка похож на редокс-сенсоры фиксации азота у *Azotobacter*, а карбокси-концевой - на сигнальный домен белка Tsr - серинового рецептора хемотаксиса. Для обеспечения аэротаксиса необходимо взаимодействие AerA только с CheY, CheA и CheW, таким образом, AerA - типичный сенсор хемотаксиса, детектирующий концентрацию кислорода.

В защите от активного кислорода участвуют также еще несколько белков, не контролируемых SoxRS и OxyR.

Взаимосвязь между окислительным стрессом и другими регуляторными системами.

Еще несколько транскрипционных регуляторов участвуют в контроле экспрессии антиоксидантных генов. Например, RpoS индуцируется, когда клетки подвергаются различным стрессам, включая голодание, осмотический шок, кислотный шок и стационарную фазу. Клетки, активно экспрессирующие RpoS, устойчивы к целому ряду стрессовых воздействий, включая высокие концентрации перекиси водорода. RpoS контролирует экспрессию целого ряда антиоксидантных генов, включая *katE*, *xthA* и *sodC*. Члены OxyR- регулона *katG*, *gorA* и *dps* также подвержены регуляции через RpoS.

Анаэробные регуляторы FNR и ArcAB также модулируют экспрессию генов *sodA*, *sodC*, *acnA* и *fumC*. Кроме того, два гомолога белка SoxS, MarA и Rob, регулируют экспрессию практически всех генов регулона SoxRS. Наконец, экспрессия одного транскрипционного фактора, Fur, контролируется как SoxRS, так и OxyR.

Литература:

1. G. Storz, J.A. Imlay. Oxidative stress. Current Opinion in Microbiology 1999, 2:188–194
2. C.E. Bauer, S. Elsen, T.H. Bird. Mechanisms for redox control of gene expression. Annu. Rev. Microbiol. 1999. 53:495-523

Подробная информация об основных регуляторах – SoxRS, FNR, OxyR, ArcB и других

3. G. Sawers. The aerobic/anaerobic interface. Current Opinion in Microbiology 1999, 2:181–187

Акцент на адаптацию к анаэробным и микроаэробным условиям. Роль FNR и ArcB.

10. Деление бактериальной клетки и его регуляция

10.1. Аппарат деления клетки *Escherichia coli*

Образование клеточной перегородки (септы) катализируется рядом жизненно важных белков, которые путем самосборки образуют кольцевую структуру (септосома или дивисома) в месте будущего деления. Сборка этой структуры происходит последовательно и инициируется белком FtsZ – структурным и функциональным аналогом эукариотических тубулинов.

Важным моментом деления является выбор правильной позиции для сборки септосомы. Ингибитор клеточного деления MinCD блокирует сборку септосомы, а другой белок, MinE, образует кольцо в середине клетки, которое защищает будущий сайт деления от действия ингибитора.

Деление тесно координировано с другими клеточными процессами, прежде всего с репликацией хромосомы, однако механизмы, управляющие такой координацией, исследованы недостаточно. В последнее время много внимания уделяется двум специальным случаям клеточного деления, связанным с дифференциацией клеток, - полярному делению при спорообразовании (у *B. subtilis*) и делению у *Caulobacter crescentus* (которое всегда приводит к образованию двух морфологически различающихся клеток). У *C. crescentus* показано существование белка (CtrA), контролирующего как репликацию

хромосомы, так и транскрипцию ключевого гена деления, *FtsZ*, и, таким образом, обеспечивающего необходимую координацию двух процессов.

Если смотреть на бактерию под микроскопом, легко сделать наблюдение, что бактериальная жизнь является по существу постоянным процессом роста, который в некоторый момент приводит к делению клетки. Чтобы делиться успешно, бактерия должна удвоить свою массу, дублировать хромосому и построить особую структуру, разделяющую две дочерних клетки - септу. Хотя главный процесс деления, цитокинез, может происходить более-менее одинаково у всех бактерий, детали деления в целом изменяются значительно в зависимости от формы бактерии и состава ее клеточной стенки. Объект этого исследования, *Escherichia coli*, является грамотрицательной бактерией, которая интенсивно изучалась генетически и биохимически и является, вероятно, организмом, о котором мы знаем больше, чем о любом другом представителе живого мира Земли. Форма этой бактерии определена жестким слоем пептидогликана или муреина, расположенного между внешней и внутренней клеточными мембранами. Пептидогликан - огромная молекула, образующая подобную мешку, но достаточно жесткую структуру, которая в сочетании с высоким внутренним осмотическим давлением действует как экзоскелет, определяющий постоянную форму клетки и ее механическую прочность в разнообразии окружающих сред с различной осмолярностью. Пептидогликан - уникальный полимер, составленный из цепей гликана, поперечно сшитых короткими пептидными мостиками. Присутствие такой жесткой структуры накладывает отпечаток на всю физиологию этой бактерии, и, в частности, на процесс деления, который и является предметом этой диссертации. Муреиновый саккулос должен быть дублирован каждый клеточный цикл, причем таким способом, который гарантирует постоянную целостность этой структуры, являющейся абсолютно необходимой для поддержания формы и жизнеспособности клетки. Эта цель достигается при помощи сложного комплекса белков, включающего муреинсинтазы, литические ферменты и множество белков, специфических для деления, но не связанных непосредственно с метаболизмом муреина. Экспрессия этих белков подвержена сложной системе регуляции, управляющей присутствием нужных количеств нужных белков в нужных местах и в нужное время и координацией клеточного деления с репликацией хромосомы и клеточным ростом.

10.1.1. Структура муреина.

Гликановые цепи муреина сложены из повторяющихся субъединиц, состоящих из двух аминокислот, *N*-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и *N*-ацетилмурамовой кислоты (MurNAc), связанных β -1,4 гликозидными связями (Рис. 10.1). Длина этих цепей значительно варьирует со средним числом 29 дисахаридных субъединиц. Цепи гликана перекрестно сшиты короткими пептидными мостами. Пентапептид L-Ala-D-Glu-DAP-D-Ala-D-Ala (DAP - *meso*-диаминопимелиновая кислота) присоединен к лактатной группе MurNAc через амидную связь с остатком L-аланина. Присутствие двуосновной кислоты (DAP в *E. coli*) необходимо для формирования перекрестных сшивок между соседними цепями гликана. Кросс-сшивка осуществляется транспептидазой, которая отщепляет концевой D-аланин и образует пептидную связь между остающимся D-аланином и свободной амино группой DAP из пентапептида, связанного с другой цепью гликана. Формирование пептидного моста все еще оставляет свободную амино группу в одном из остатков DAP, что делает возможным присоединение дополнительной цепи гликана. Такие связи, соединяющие три цепи гликана, обнаруживаются приблизительно в 5 % случаев. В зрелом пептидогликане один или оба остающихся D-аланиновых остатка удаляются из пептидных мостиков карбоксипептидазами. Пептидные цепи располагаются по спирали вокруг гликановых цепей под углами приблизительно в 90° друг к другу. Если муреин однослоен, как в *E. coli*, пептидные мосты могли бы поэтому соединять каждый второй остаток MurNAc в соседних цепях гликана. Реальная степень поперечных сшивок близка к ожидаемой по крайней мере в некоторых условиях. Такое строение молекулы приводит к созданию прочной ковалентно связанной сетчатой структуры, фактически одной огромной молекулы, в которую заключена большая часть бактериальной клетки. Такая структура позволяет муреиновому саккулосу противостоять внутреннему давлению в несколько атмосфер. И именно комбинация высокого внутреннего давления с жестким муреиновым "мешком" определяет фиксированную форму бактериальной клетки. Очевидно, что такая структура обеспечивает бактерии много преимуществ, но также создает и несколько проблем, наиболее важной из которого является рост жесткого саккулуса - он должен расти и делиться таким способом,

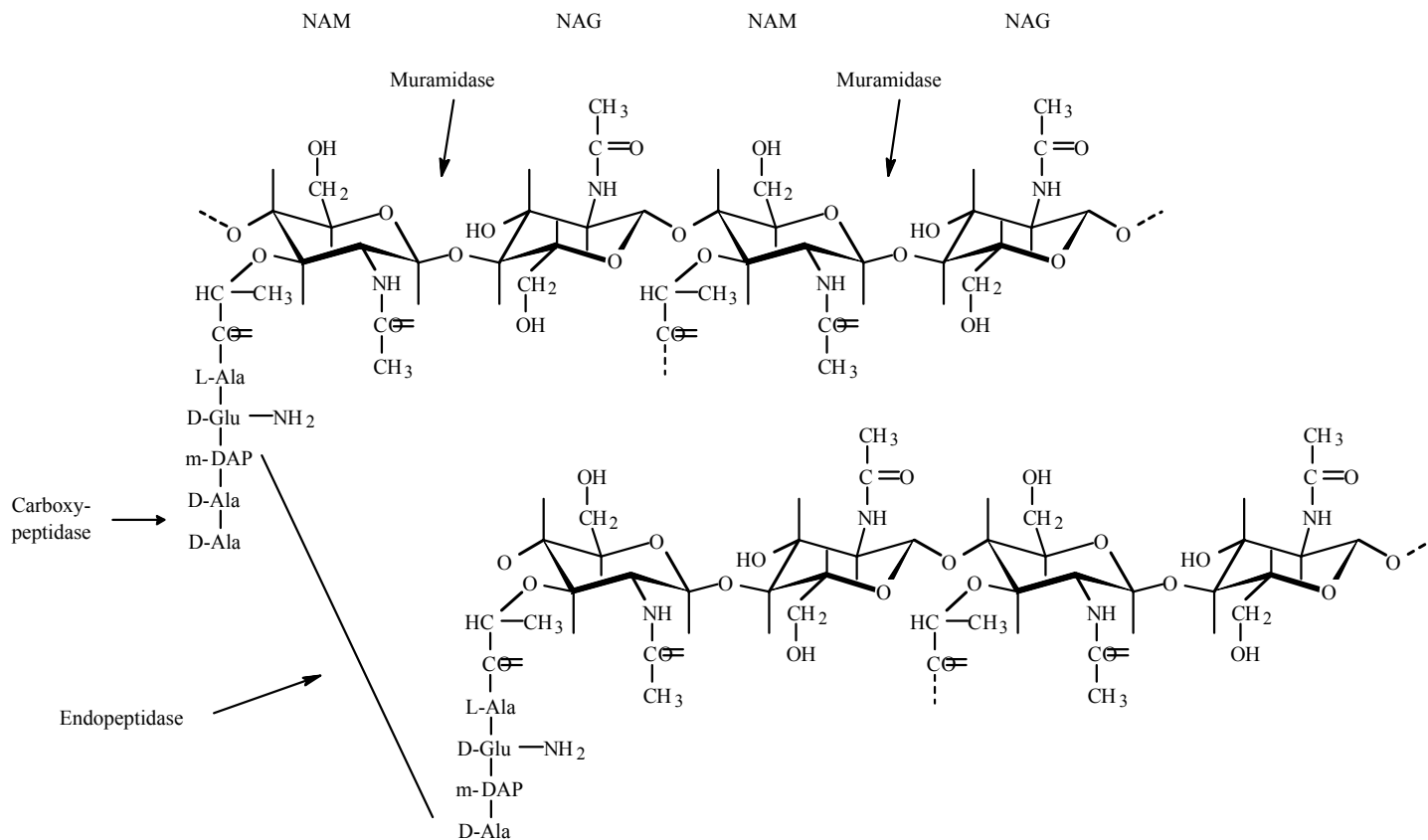


Рис.10.1. Структура пептидогликана

чтобы целостность всей структуры экзоскелета, противостоящей внутреннему осмотическому давлению, никогда не нарушалась.

10.1.2. Модели элонгации и деления муреинового саккулуса.

Другим возможным путем вставки нового материала в саккулус была бы стратегия "присоединяй, а затем разрывай", используемая грамположительными бактериями, где новые слои муреина добавляются в ненапряженном состоянии ниже внешних слоев, несущих механическое напряжение. Эти новые цепи вводятся в действие медленно, по мере деградации внешних слоев гидролазами. Подобная форма роста саккулуса предложена для *E. coli* в другой модели. Эта модель постулирует, что новый материал должен быть присоединен к существующему слою муреина прежде, чем любые ковалентные связи могут быть расщеплены. Гипотеза объясняет роль тримерных поперечных сшивок и фактически полагается на их существование. Тримерные сшивки, как полагают, являются сайтами присоединения нового добавляемого материала. Самый маленький такой сайт - одиночная цепь гликана, но минимальная структура нового муреина, добавленного к этому сайту, должна по структурным причинам состоять из трех цепей. Чтобы объяснить экспериментально наблюдаемую вставку одиночных цепей гликана, постулируется существование "праймерной" цепи, синтезируемой монофункциональной трансгликозилазой. Никакое доказательство для существования таких "праймерных" цепей не доступно, но фермент, способный к созданию таких цепей, монофункциональная гликозилтрансфераза, известен. Предполагается, что триплет цепей гликана формируется путем синтеза двух новых цепей, сопряженного с их одновременным «пришиванием» к праймерной цепи. Этот триплет затем присоединяется к свободным amino группам DAP из пептидных мостиков с обеих сторон цепи-мишени в существующем муреине. Цепь-мишень затем удаляется, и три новых цепи выдвигаются в плоскость муреина внутренним давлением (Рис. 10.2).

Минорная модификация состава мультиферментного комплекса могла бы быть достаточна для обеспечения синтеза муреина в течение клеточного деления - RBP3 использовался бы вместо RBP2 и, возможно, монофункциональная трансгликозилаза была бы добавлена. В этом случае триплеты муреина могли бы синтезироваться за один шаг, так как, вопреки тому, что наблюдается при элонгации, при

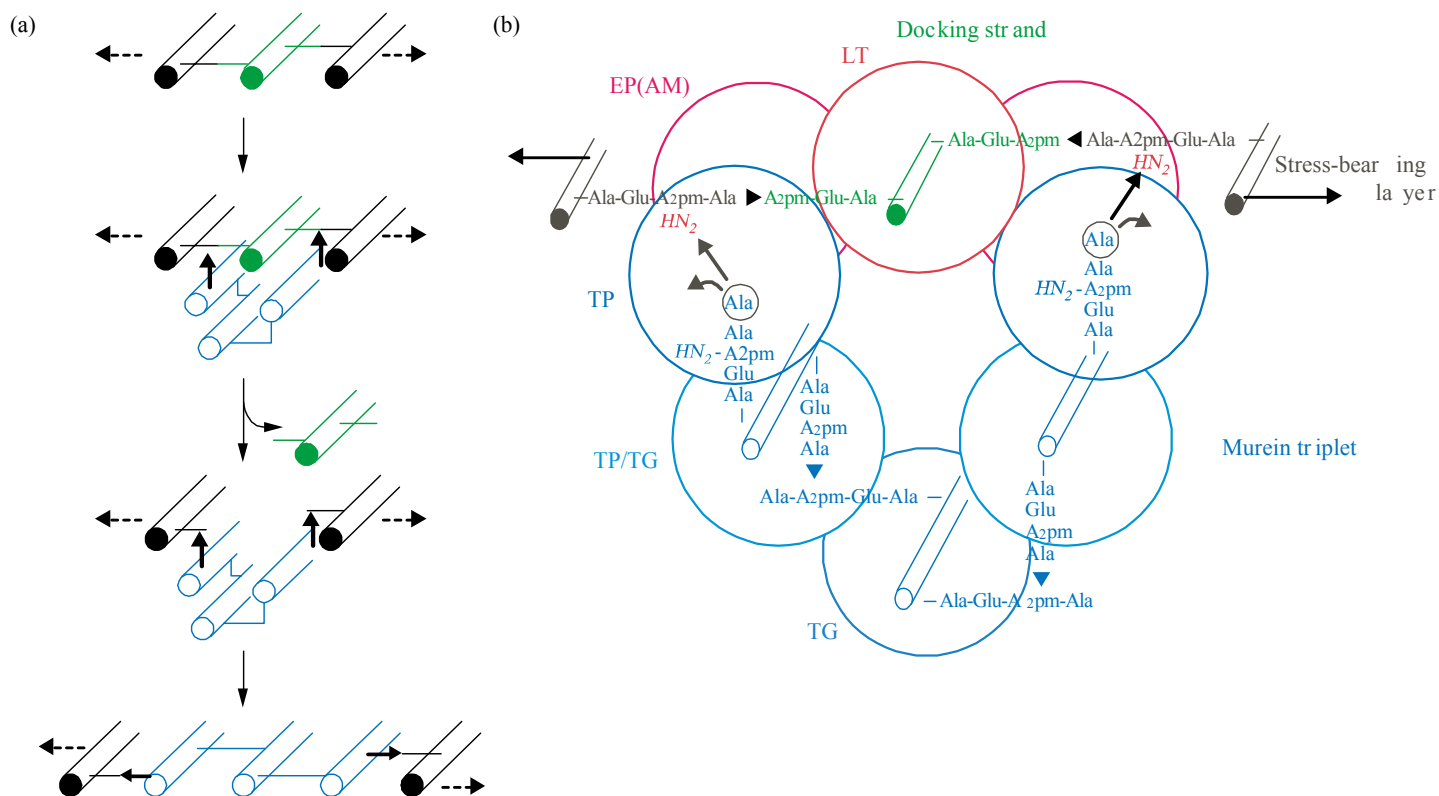


Рис.10.2. Элонгация пептидогликана

делении несколько новых цепей муреина вставляются рядом. Небольшая задержка удаления старой цепи вела бы к инвагинации муреина в результате добавления следующего триплета муреина до того, как старая цепь перед предыдущим триплетом будет удалена.

10.1.3. Гены клеточного деления.

Определение специфического гена клеточного деления может быть несколько затруднено. Клеточное деление, конечно, не возможно без многих из генов, описанных выше, и мутации в многих из их летальны, но термин "ген клеточного деления" обычно используется, когда мутация непосредственно ведет к видимому дефекту в делении без других непосредственных эффектов на клеточный рост, формирование клеточной стенки, репликацию ДНК или сегрегацию. Обычно, блок деления не приводит к немедленному прекращению роста, и клетки продолжают удлиняться некоторое время. Это приводит к формированию длинных филаментов, поэтому большинство жизненно важных генов клеточного деления имеют аббревиатуру *fts* (*f*ilamentous *t*emperature *s*ensitive). Если говорить о гене, который является абсолютно необходимым для деления каждой бактерии, то единственный ген из известных в настоящее время соответствует этому определению - *ftsZ* (даже этот ген вероятно отсутствует в по крайней мере одной бактерии - недавно сиквенированный геном *Chlamydia trachomatis* не имеет узнаваемого гомолога *ftsZ*). Но *ftsZ* в одиночку оказывается достаточным для деления только самых простых бактерий, например *M. genitalium*, живущих в идеальной богатой питательными веществами окружающей среде при постоянной температуре и постоянном осмотическом давлении и следовательно не нуждающихся (и не имеющих) муреиновой клеточной стенки. Другие бактерии должны иметь дополнительные структуры, чтобы выживать в своих местообитаниях. Одна из этих дополнительных структур - муреиновая клеточная стенка, типичная для огромного большинства

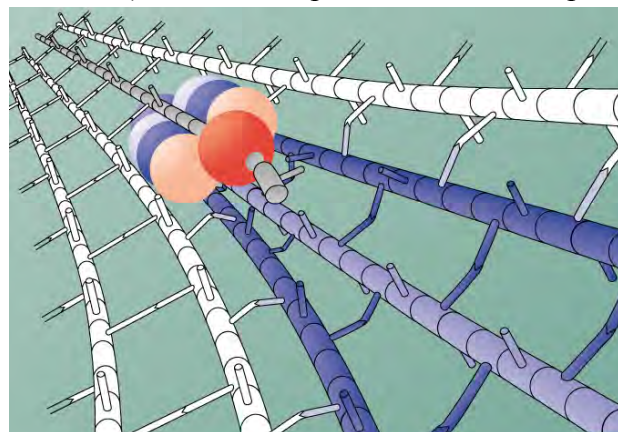


Рис.10.3. Молекулярная машина биосинтеза пептидогликана

Eubacteria. Присутствие клеточной стенки немедленно создает серьезные проблемы при делении. Жесткой и находящейся под постоянным осмотическим давлением изнутри муреиновой клеточной стенке требуется набор белков для правильного разделения пополам при делении клетки без нарушения целостности структуры, и эти белки должны действовать координированно с другими белками, необходимыми для деления как такового.

ftsZ - ген клеточного деления, которому уделяется наибольшее внимание в последнее время, после обнаружения того, что его продукт образует кольцо на внутренней стороне цитоплазматической мембраны в центре клетки. Ген *ftsZ*, расположенный в кластере *mra* на 2.5 минуте хромосомной карты, кодирует наиболее многочисленный белок клеточного деления, который присутствует в количестве от 5,000 до 20,000 копий на клетку. FtsZ белок разделяет некоторое сходство последовательности с эукариотическими тубулинами, что согласуется с его слабой ГТФазной активностью. Недавнее определение кристаллических структур FtsZ и тубулина подтвердило, что трехмерные структуры этих белков очень похожи несмотря на низкий уровень сходства первичной последовательности. N-концевые ГТФ-связывающие домены этих белков являются фактически идентичными, и C-концевые домены также очень схожи, хотя гомология первичных последовательностей C-концевых доменов не детектируется. Функциональное сходство FtsZ с тубулинами подтверждается его способностью собираться *in vitro* в протофиламенты и мини-кольца, которые близко напоминают структуры, формируемые тубулином. Учитывая диаметр этих протофиламентов и диаметр клетки, количество FtsZ в клетке достаточно, чтобы образовать протофиламент, окружающий клетку 20 раз. Способность FtsZ полимеризоваться (димеризоваться), была недавно продемонстрирована *in vivo*.

В настоящее время считается, что сокращение кольца, образованного молекулами FtsZ, приводит к продвижению молекулярных машин, синтезирующих клеточную перегородку в месте деления. Формирование этого кольца является самым ранним видимым признаком деления и может быть обнаружено очень рано в клеточном цикле. Было также показано, что кольца FtsZ могут образовываться в *ftsA*, *ftsQ* и *ftsI* мутантах, так же, как и в *ftsW* и *ftsK* штаммах, таким образом указывая, что продукты этих генов не требуются для сборки кольцевой структуры и скорее действуют позже в процессе деления. FtsZ может также образовывать и некольцевые структуры, например дуги в *rodA_{su1}* мутанте и спирали в штамме *ftsZ26*. Эти структуры могут сокращаться и таким образом определять форму отклоняющейся септы. Это также косвенно предполагает, что сборка кольца FtsZ начинается на "сайте нуклеации" на внутренней мембране (возможно, другом белке клеточного деления), от которого и начинается его двунаправленная полимеризация. Другой подход, основанный на наблюдении гибридов FtsZ-GFP *in vivo*, также подтверждает присутствие Z-колец в живых клетках; более того, когда гибридный белок сверхпродуцируется, наблюдаются спиральные структуры. FtsZ-GFP также иногда образует двойные кольца в клеточном центре. Делеция 67 неконсервативных C-концевых остатков FtsZ в гибридном белке предотвращает формирование Z-колец, но не останавливает полимеризации, более того, полимеры, формирующиеся с этим делеционным вариантом (спирали и толстые листы), оказываются гораздо более устойчивыми и имеют более яркую флюоресценцию.

Гомологи FtsZ были найдены в разнообразных *Eubacteria* и *Archaea*, включая все организмы, для которых полные геномные последовательности уже определены (кроме *C. trachomatis*); этот белок был найден даже в высшем растении, *Arabidopsis thaliana*, где он кодируется ядерным геном, но очевидно требуется для деления хлоропластов.

Свойства Z-кольца, главным образом его формирование рано в клеточном цикле, местоположение в середине клетки на будущем сайте деления, и его видимое сокращение в течение процесса деления, обеспечивают привлекательное основание для предположений, что кольцо FtsZ может быть сайтом сборки для других белков, вовлеченных в деление, а также движущей силой или, по крайней мере, ее составляющей, направляющей образование септы. Для выполнения этих двух предполагаемых функций FtsZ должен взаимодействовать по крайней мере с некоторыми из предложенных участников комплекса деления. Некоторое доказательство для такого взаимодействия появилось недавно и обсуждается позже в этой главе.

Ген *ftsA*, расположенный перед *ftsZ*, кодирует 46 kDa белок, присутствующий в количестве приблизительно 150 молекул на клетку. Правильное отношение FtsA к FtsZ (1:100) является необходимым для успешного деления. Цитоплазматическая форма FtsA может фосфорилироваться и в фосфорилированном состоянии является способной к связыванию АТФ, тогда как в нефосфорилируемой форме белок связывается с клеточной мембраной. Белок - член большого

семейства АТФ-связывающих белков, которые включают актины и белки теплового шока (HSP70), и было предположено, что белок имеет трехмерную структуру, типичную для представителей этого семейства. Однако мутации по основаниям, которые, как предполагается, являются необходимыми для функции АТФазы, так же, как и по фосфорилируемым остаткам, не изменяет способность белка комплементировать известные температурочувствительные мутации *ftsA*. Недавно было показано с использованием иммунофлуоресцентной микроскопии и GFP гибридов, что FtsA следует непосредственно за FtsZ во время деления - кольцо визуализируется в середине клетки, немного позже чем кольцо FtsZ, и эти структуры ведут себя точно тем же самым способом в различных мутантах, которые имеют некольцевые FtsZ структуры (спирали или дуги). FtsA, вероятно, включается в формирующуюся структуру септы немедленно после того, как образуется кольцо FtsZ. Это утверждение основано на факте, что кольца FtsZ могут образовывать в мутантах *FtsA*, но не наоборот. Еще одно доказательство в пользу этого - то, что гибридный белок FtsA-GFP, обычно локализующийся в центре клеток, образует спиральные структуры (такие же, как и у FtsZ-GFP гибридов), когда концентрация FtsZ увеличена. Также, часть гибридного белка FtsA-GFP оказывалась ассоциированной с мембраной, что подтверждает существование двух субпопуляций FtsA, локализованных в цитоплазме или клеточной мембране согласно состоянию их фосфорилирования.

ftsQ находится перед геном *ftsA*. Его продукт - 31 kDa белок цитоплазматической мембраны с единственной N-концевой трансмембранной α -спиралью. Большая часть белка расположена в периплазме. FtsQ белок, по оценкам, присутствует в количестве от 50 до 100 копий на клетку. Мутанты этого гена дают филаменты без признаков сокращений, но сокращения становятся видны, если ввести вторую мутацию в гене *rodA*, что свидетельствует в пользу действия FtsQ после FtsZ. Цитоплазматический и трансмембранный домен FtsQ не являются специфическими для его функции и могут быть заменены мембранным якорем от другого белка. Периплазматический домен - единственная часть белка, требующаяся для септальной локализации и достаточная для комплементации *ftsQ1_{ts}* мутанта. Правильная локализация FtsQ зависит от цитоплазматических белков FtsZ и FtsA, но не от периплазматических FtsL или FtsI. Это свидетельствует в пользу того, что FtsQ действует на промежуточной стадии образования септы и вероятно взаимодействует с периплазматическим белком, отличным от FtsL и FtsI, для достижения правильной локализации во время деления.

ftsW расположен между *murD* и *murG* в генном кластере *mra*. Мутанты *ftsW* филаментируют без видимых сокращений даже когда объединены со сферическими мутациями, что предполагает раннюю роль в клеточном делении. Высокая гидрофобность и гомология с RodA предполагают локализацию белка во внутренней мембране. Было предложено, что белок FtsW взаимодействует с RBP3, но нет никакого прямого доказательства этого взаимодействия. Ранний блок деления в мутантах *ftsW* может быть обусловлен стабилизацией кольца FtsZ, поскольку кольцо отсутствует у 50 % филаментов в штамме, полностью лишенном FtsW, и число колец уменьшено у оставшихся 50 %.

ftsN ген, расположенный на 88.5 минуте, кодирует 36 kDa белок с трансмембранным сегментом около N-конца, коротким N-концевым цитоплазматическим и большим периплазматическим доменами. Белок присутствует в количестве приблизительно 50 молекул на клетку. Цитоплазматический домен белка оказывается абсолютно необязательным, и трансмембранный сегмент может быть заменен трансмембранным доменом MalG или даже отрезаемой сигнальной последовательностью белка MalE, из чего следует, что только периплазматическая часть белка определяет его специфическую функцию. С другой стороны, перемещение белка в периплазму абсолютно необходимо для его нормального функционирования. Ген был первоначально изолирован как мультикопийный супрессор *ftsA12* мутации, а затем была показана его способность супрессировать *ftsI23* и *ftsQ1* мутации, две мутации *ftsW* и *ftsK44*. Так как истощение клеточного запаса FtsN ведет к филаментации (длинные несегментированные филаменты), он считается жизненно необходимым белком клеточного деления. Мутантный фенотип, количество белка и его местоположение вели к предложению, что FtsN функционирует вместе с FtsQ, FtsI и FtsL в 'стехиометрическом комплексе' на сайте формирования септы.

ftsL (*mraR*) находится близко к самому началу генного кластера *mra*. Его продукт - 13.6 kDa белок цитоплазматической мембраны с одним пронизывающим мембрану доменом и большей частью белка, расположенной в периплазме. Белок присутствует в количестве от 30 до 40 копий на клетку, и мутация ведет к продукции несегментированных филаментов. Белок содержит лейциновую застежку, которая

может быть жизненно важна для его функции, возможно управляя его димеризацией. FtsL - мембранный белок с маленькими цитоплазматическими и трансмембранными доменами и большим периплазматическим доменом. В отличие от некоторых других белков деления, и цитоплазматические, и пронизывающие мембрану домены оказывались специфичными и жизненно важными для правильного функционирования этого белка. Недавняя работа продемонстрировала, что, подобно нескольким другим белкам клеточного деления, FtsL образует кольцевую структуру в центре клетки довольно поздно в процессе деления. Эта локализация зависит от функции FtsZ, FtsA и FtsQ, но не FtsI. С другой стороны, локализация FtsQ, FtsA и FtsZ не требует FtsL.

zipA ген был обнаружен недавно при помощи процедуры аффинного блоттинга, в течение поиска белков, специфично взаимодействующих с FtsZ. Ген оказался жизненно важным. Его инсерционная инактивация в присутствии комплементирующей термочувствительной плазмиды дает длинные неsegmentированные филаменты при непермиссивной температуре. Интересно, что сверхэкспрессия ZipA также блокировала клеточное деление, но этот блок может быть полностью преодолен путем увеличения количества FtsZ, что также свидетельствует в пользу возможности взаимодействия между этими двумя белками. Кроме того, гибриды ZipA::GFP локализовались в кольцевой структуре в середине клеток в 91 % случаев, иногда будучи видимыми даже в очень молодых клетках. Это напоминает поведение FtsZ колец, описанных. ZipA - белок с предсказанным молекулярным весом 36 kDa, который мигрирует как 50 kDa на гелях SDS-PAGE. Самый N-конец белка предположительно локализуется во внутренней мембране, а остальная часть - в цитоплазме. Немедленно после пронизывающего мембрану домена есть и богатая пролином и глутамином область размером 103 остатка, которая может образовывать жесткий линкер между мембранным якорем и С-концевым доменом белка. Эта структура, так же, как и местоположение белка, делает его хорошим кандидатом на роль связки между мембраной и кольцом FtsZ. Возможность прямого взаимодействия между ZipA и FtsZ поддержана присутствием мотивов в последовательности ZipA, подобных доменам связывания с микротрубочками нескольких эукариотических белков, и демонстрации стабилизации FtsZ-протофиламентов *in vitro* при помощи ZipA. Hale и de Boer первоначально предложили возможную роль ZipA как центра нуклеации сборки кольца FtsZ (что соответствует его присутствию в количестве 1-10 % FtsZ). Это предположение, однако, может быть и неверно, так как более поздняя работа показала, что Z-кольца по-прежнему образуются в отсутствие ZipA, хотя количество сформированных колец и уменьшаются. Срединная локализация самого ZipA оказывалась FtsZ-, но не FtsA- или FtsI зависимой. И, в свою очередь, септальная локализация FtsA не зависела от ZipA.

ftsI находится в том же самом кластере, что и *ftsQAZ*, и кодирует специфическую для септы синтазу муреина, PBP3. Белок, как оценивают, присутствует в 50-100 копиях в клетку. PBP3 - трансмембранный белок с каталитическим доменом, расположенным в периплазме. Мутанты филаментируют с сокращениями, видимыми только после введения сферической мутации. PBP3 - специфическая для деления транспептидаза. Было высказано предположение, что PBP3 требуется какой-то дополнительный белок, чтобы проявить трансгликозилазную активность, подобно PBP2 и RodA белкам. FtsW был предложен для этой функции на основе сходства последовательности между FtsW и RodA; доказательство для этого взаимодействия, однако, отсутствует.

Белок локализуется к септе на последних стадиях деления; часть белка также наблюдается на клеточных полюсах. Для правильной септальной локализации белка требуется его собственный трансмембранный домен, а также FtsZ, FtsA, FtsQ, и FtsL.

Ген *ftsK* расположен на 20 минуте хромосомы после SOS-индуцибельного промотора (*dinH*) и кодирует цитоплазматический мембранный белок с предсказанным размером приблизительно 147 kDa. Белок высоко гомологичен нескольким белкам SpoIIIЕ грамположительных бактерий. В *B. subtilis* этот белок отвечает за правильное распределение одной из сестринских хромосом в спорный компартмент, а также может быть вовлечен в завершение септы. Кроме того, С-концевая часть белка имеет существенную гомологию со множеством Tга белков плазмид *Streptomyces* и конъюгативного транспозона Tn916. FtsK, подобно SpoIIIЕ, имеет гидрофобную N-концевую область с несколькими потенциальными трансмембранными сегментами и большим цитоплазматическим доменом, содержащим нуклеотидсвязывающий мотив. Белок локализован в центре клетки во время клеточного

деления, а при помощи гибрида N-концевого мембранного домена FtsK с белком GFP было показано, что только N-концевые 15 % белка требуются для правильной локализации. Та же самая N-концевая часть достаточна для комплементации *ftsK44* мутации. Изолированная первой термочувствительная мутация *ftsK44* локализуется в этой части белка в одном из α -спиральных трансмембранных сегментов, и это мутационное изменение фактически предотвращает правильную локализацию белка. Фенотип двойного мутанта *ftsK rodA* свидетельствует в пользу того, что белок действует поздно в делении. Это поддержано выбором времени локализации FtsK - FtsK-GFP гибрид локализуется на сайте деления только тогда, когда уже есть видимое сокращение. С другой стороны, данные иммунофлуоресценции указывают на то, FtsK локализуется к септе рано, что поддерживается гладким фенотипом филаментов, образуемых нулевым мутантом.

Недавние данные предлагают, что С-концевая часть белка, которая имеет самую высокую гомологию с SpoIIIЕ и другими белками с "ДНК-мобилизующей" функцией, действительно требуется для нормального разделения ДНК между сестринскими клетками в течение деления. Чтобы подвести итог, N-концевая часть FtsK вероятно играет некоторую роль при завершении септы, в то время как С-концевой домен необходим, чтобы переместить ДНК, которая могла бы быть поймана закрывающейся септой, в правильный компартмент.

10.1.4. Сегрегация нуклеоидов.

Очевидно, клетка должна копировать свою хромосому в течение каждого клеточного цикла и гарантировать, что полученные копии окажутся в различных дочерних клетках. Поэтому деление должно быть так или иначе скоординировано с репликацией хромосомы и сегрегацией нуклеоидов. Поскольку скорость репликации ДНК при данной температуре постоянна, клетки достигают необходимого числа полных хромосом к времени деления через контроль инициации репликации - интервалы между событиями инициации равны интервалам между делением. Это приводит к тому, что быстро растущие клетки имеют множественные хромосомы.

Разделение сестринских нуклеоидов, очевидно, является необходимой предпосылкой для деления, и похоже, что пространство, свододное от нуклеоидов, может определять расположение септы (и, в свою очередь, формирование септы ингибируется в областях, где нуклеоид присутствует). В настоящее время нет полного согласия по поводу механизмов, осуществляющих разделение нуклеоидов, но недавно было продемонстрировано, что *E. coli* (также как другие бактерии) имеет активный подобный митотическому аппарат сегрегации. К сожалению, не известно, какие белки вовлечены в быструю сегрегацию точек начала репликации хромосом. Два возможных кандидата на эту роль - FtsK и продукты *muk* генов.

mukB мутанты имеют слегка филаментирующий фенотип и существенный процент безъядерных клеток. У мутанта хорошо выражено нерегулярное разделение нуклеоидов. MukB - самый крупный из охарактеризованных прокариотических белков. Он разделяет некоторое сходство с эукариотическими миозинами и имеет доменную структуру, напоминающую об эукариотических моторных белках кинезине и миозине, что совместимо с его предложенной функцией моторного белка, перемещающиеся нуклеоиды. Эта возможность поддерживается недавней демонстрацией специфического связывания MukB с микротрубочками. В дном опероне с *mukB* расположены два других гена, ***mukE*** и ***mukF***. Их инактивация также ведет к дефекту в разделении нуклеоидов и продукции безъядерных клеток.

Очищенный MukB белок имеет низкую АТФазную и ГТФазную активности. N-концевой домен MukB связывается с высокой аффинностью с FtsZ. FtsZ может стимулировать АТФазную и ГТФазную активности MukB. Эти свойства совместимы с предполагаемой функцией MukB как моторного белка, использующего FtsZ как опору для генерации силы внутри клеток *E. coli*. Поскольку кольцо FtsZ собирается рано, MukB мог бы использовать это как "маркер", чтобы отодвинуть нуклеоиды от сайта, где будет сформирована будущая септа. В соответствии с этим продемонстрировали двунаправленное перемещение регулятора инициации репликации SeqA. Это перемещение происходило после формирования Z-кольца и требовало присутствия MukB.

Продукт гена ***ftsK*** является другим кандидатом на участие в разделении хромосомы. Первичная структура FtsK имеет сильное сходство с белком SpoIIIЕ *B. subtilis* и множеством Tга белков конъюгативных плазмид *Streptomyces*, для которых участие в перемещении ДНК было продемонстрировано. Первоначальная *ftsK44* мутация не влияла на сегрегацию хромосом, но, когда

экспрессия С-концевого домена была уменьшена, дефект сегрегации был действительно обнаружен.

10.1.5. Дифференциация сайтов деления: система *min*.

Функция генов в локусе *minB* должна предотвратить формирование септы в неправильном месте. Локус состоит из трех генов, *minC*, *minD* и *minE*. Белки MinC и MinD действуют вместе, образуя неспецифический ингибитор формирования септы, блокирующий клеточное деление на всех доступных сайтах. Белок MinE предотвращает действие этого ингибитора на внутренних сайтах, тем не менее разрешая ему действовать на клеточных полюсах. Хотя MinC обычно нуждается в активации белком MinD, чтобы функционировать должным образом, он может также действовать вместе с другим ингибитором деления, DicB. В мутантах *minB* (лишенных MinC или MinD) септа может формироваться или внутри клетки или на ее полюсах, но общее количество септ то же самое, что в нормальных клетках. Каждое полярное деление потребляет "квант" "потенциала деления" и одно центральное деление утрачивается, таким образом делая клетку длиннее. Следует также заметить, что время до следующего деления обратно пропорционально длине клетки, но даже в самых длинных клетках только одна септа может формироваться одновременно.

Местоположение MinD во внутренней мембране было определено иммуноэлектронной микроскопией. Было также показано, что MinD имеет активность АТФазы *in vitro*.

Было показано, что, несмотря на свой маленький размер (88 АК), белок MinE имеет три отдельных домена с различными функциями. Маленький N-концевой домен необходим, чтобы противодействовать активности ингибитора деления MinCD, центральная область может быть вовлечена в димеризацию или олигомеризацию, а большая С-концевая часть определяет топологическую специфичность функции MinE, позволяя ему действовать только на внутренних сайтах деления. Недавно было показано, что MinE образует кольцевую структуру около середины молодых клеток. Формирование этого кольца требовало MinD, но было независимо от MinC и FtsZ. Таким образом, в настоящее время MinE выглядит как белок, первым появляющийся на формирующемся сайте деления, что, возможно, является необходимым для правильной локализации кольца FtsZ, хотя не для его формирования.

Пока еще в точности не известно, как работают Min белки. Попытка показать прямое взаимодействие этих трех белков с их наиболее вероятной мишенью, FtsZ, оказалась неудачной; хотя этот подход, использующий дрожжевую двухгибридную систему, легко показывает взаимодействие между членами системы Min и то, что MinE уменьшает взаимодействие между MinC и MinD. Природа топологического сигнала, узнаваемого белком MinE, также неизвестна.

10.1.6. Сборка и порядок действия белков клеточного деления на сайте деления.

Бактериальное клеточное деление, хотя и кажется простым на первый взгляд, является фактически весьма сложным процессом, в котором принимает участие много белков. Очевидно, что действие этих белков должно быть скоординировано так или иначе, и самый легкий путь, которым такая координация могла бы быть достигнута - через формирование макромолекулярного комплекса на сайте деления. Предполагается, что эта, все еще в значительной степени гипотетическая, структура, названная дивисомой или септатором, собирается на сайте деления в самом его начале. Процесс, вероятно, начинается на сайте нуклеации, где инициируется сборка Z-кольца. Предполагается, что другие белки деления включаются в состав дивисомы после формирования Z-кольца.

Хотя генетическое доказательство в пользу возможности взаимодействия между генами клеточного деления существовало в течение некоторого времени, только прямая демонстрация белок-белкового взаимодействия могла доказывать, что это взаимодействие действительно имеет место. Эти данные начали накапливаться недавно. *zipA* ген был фактически обнаружен через прямое связывание его продукта с FtsZ. Специфическое связывание очищенного N-концевого домена MukB с FtsZ было недавно продемонстрировано. Косвенное доказательство для FtsA-FtsZ взаимодействия обеспечивается исследованиями локализации гетерологичного FtsA в *E. coli*. FtsA белок из *Rhizobium meliloti* или *Agrobacterium tumefaciens* был способен локализоваться правильно в клетках *E. coli*, только если FtsZ белок от того же самого организма также обеспечивался. Взаимодействие между FtsZ и FtsA также наблюдалось при использовании дрожжевой двухгибридной системы. Также, косвенное доказательство существует для возможного взаимодействия FtsW с PBP3 и PBP3 и PBP1B. Взаимодействие между высокомолекулярным PBP и литическими ферментами уже было обсуждено выше.

Недавнее изучение локализации белков клеточного деления с использованием

иммунофлуоресценции и гибридов с GFP обеспечило информацию относительно локализации в середине клетки некоторых белков, что является предпосылкой для их участия в дивисоме. Локализация в сайте деления была сначала показана для FtsZ с использованием окрашивания иммунозолотом, а затем подтверждена иммунофлуоресцентной микроскопией и *in vivo* с использованием гибридов с GFP. Несколько других белков деления также локализовались в септе - FtsA, FtsQ, ZipA, FtsW.

Недавние эксперименты с локализацией белков деления в нескольких *fts* мутантах дают ключ к порядку их привлечения в дивисому и, возможно, к последовательности их действия во время деления. Расположение FtsA в середине клетки зависит от предшествующего формирования Z-кольца. Перемещение FtsQ к септе требует FtsZ и FtsA, но не FtsL и FtsI. Септальная локализация FtsI оказывается зависящей от присутствия FtsZ и FtsA, так же, как FtsL и FtsQ. В то же время, сборка колец FtsZ слегка нарушена, если инактивирован PBP3, а сокращение кольца не происходит. FtsN также образует кольца в центре клетки, но требует не только FtsZ, но также и FtsA, FtsQ и FtsI для правильной локализации. Хотя фенотип первоначального *ftsK* мутанта и результаты, полученные с GFP гибридами предполагали позднее время действия для FtsK, иммунофлуоресцентное мечение показало, что белок локализовался к септе довольно рано; только FtsZ и FtsA, но не FtsQ или FtsI требуются для правильной локализации.

Подводя итог, можно сказать, что доступные данные предлагают следующий порядок сборки в "дивисому" нескольких белков деления: FtsZ-FtsA-FtsQ-FtsL-FtsI. FtsN может быть включен в септу после FtsI, но мультикопийная супрессия мутаций в генах, кодирующих FtsA, FtsQ, FtsI и FtsK, может указывать более раннюю роль для белка. FtsK включается в септу после FtsA, но не известно, зависят ли более поздние белки от его локализации. ZipA и FtsA локализируются к септе после FtsZ и не требуют присутствия друг друга для этой локализации. FtsW может действовать прежде FtsZ, по крайней мере это требуется для стабилизации Z-кольца (Рис. 10.4).

FtsI - фермент, абсолютно требуемый для синтеза муреина септы, - является одним из последних белков, включаемых в дивисому. С другой стороны, сокращение Z-кольца требует активности FtsI. Это указывает, что целая структура дивисомы, возможно, должна быть собрана прежде, чем начнется синтез септы и ее сокращение. FtsI может также обеспечивать связь между периплазматическим пептидогликансинтезирующим комплексом (обсужденным выше) и белками клеточного деления. Хотя прямое взаимодействие FtsI с любым другим белком клеточного деления не было продемонстрировано, косвенные доказательства таких взаимодействий свидетельствуют в пользу того, что FtsI - часть дивисомы. Поскольку непосредственное связывание FtsI с другими муреиновыми синтетазами и литическими ферментами было обнаружено, эти белки также должны входить в состав дивисомы.

Важная проблема возникает из-за того, что многие из белков клеточного деления присутствуют в количествах, намного меньших, чем FtsZ. Например, соотношение FtsA к FtsZ обычно составляет 1:100. FtsQ, FtsL (?) и FtsN (?) вероятно присутствуют в еще меньших количествах, чем FtsZ. Было предложено, что "минорные" белки образуют комплексы друг с другом, "подборки", которые присоединены к Z-кольцу, но расположены далеко друг от друга в начале

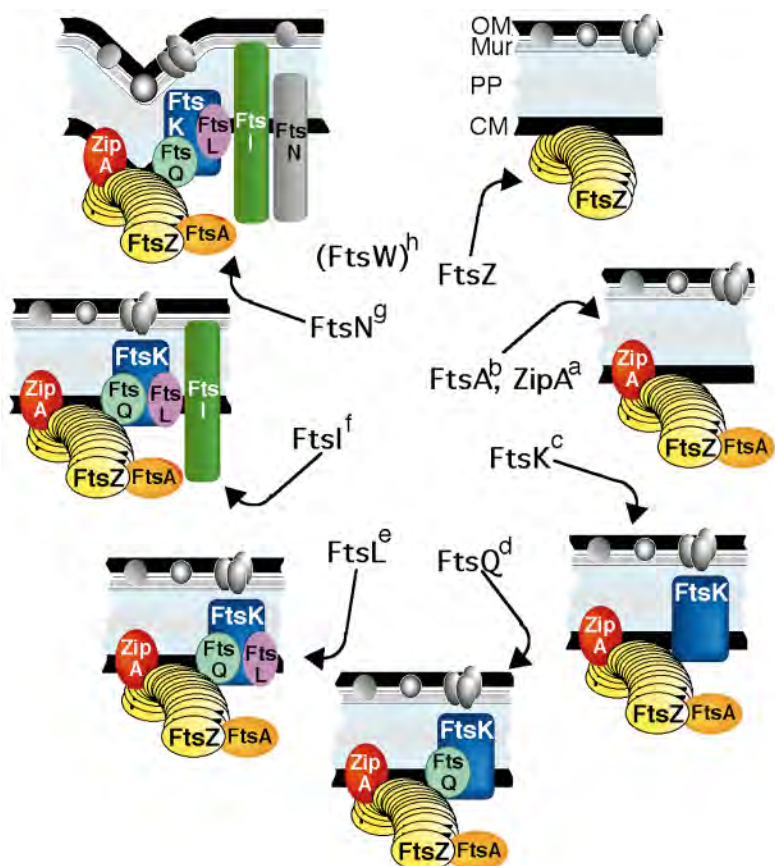


Рис.10.4. Сборка аппарата деления *Escherichia coli*

сокращения, сдвигаясь ближе друг к другу только в процессе сокращения. Не известно, какая сила является ответственной за сокращение кольца и прогресс деления.

Конечная стадия деления должна отличаться от сокращения, потому что дивисома должна быть демонтирована, и дочерние клетки должны разделиться, что может (или нет) требовать дополнительных белков для расщепления пептидных связей, которые вероятно скрепляют две клетки. Альтернативно, этот шаг мог быть выполнен "нормальными" литическими ферментами.

10.1.7. Регуляция клеточного деления.

Наиболее важный вопрос о регуляции клеточного деления – о правильном выборе времени сборки и точном размещении септы, - все еще остается в значительной степени без ответа. Есть, однако, некоторая информация относительно других аспектов регуляции деления - регуляция транскрипции нескольких генов деления, участие белковых регуляторов на уровне транскрипции или прямых белок-белковых взаимодействий и специальный случай регуляции деления во время SOS ответа.

Транскрипционная регуляция.

Большинство генов клеточного деления расположены в большом генном кластере *dcw* (*d*ivision and *c*ell *w*all) или *mra* на 2 минуте хромосомы *E. coli* (Рис. 10.5). Несколько *mur* генов, вовлеченных в синтез пептидогликана, также расположены в этом кластере. Транскрипционные терминаторы не были найдены в пределах этого большого кластера из 16 генов, что вело к предположению, что весь кластер составляет один оперон. Гены в кластере обычно разделены только несколькими парами оснований, а в некоторых случаях даже перекрываются, что предполагает возможность трансляционного сопряжения. Поскольку структура оперона обычно подразумевает какую-то координацию генной регуляции, проводились исследования регуляции транскрипции генов в этой области. Большинство генов в кластере имеет несколько промоторов, в различной степени ответственных за их транскрипцию и иногда реагирующих на различные стимулы окружающей среды.

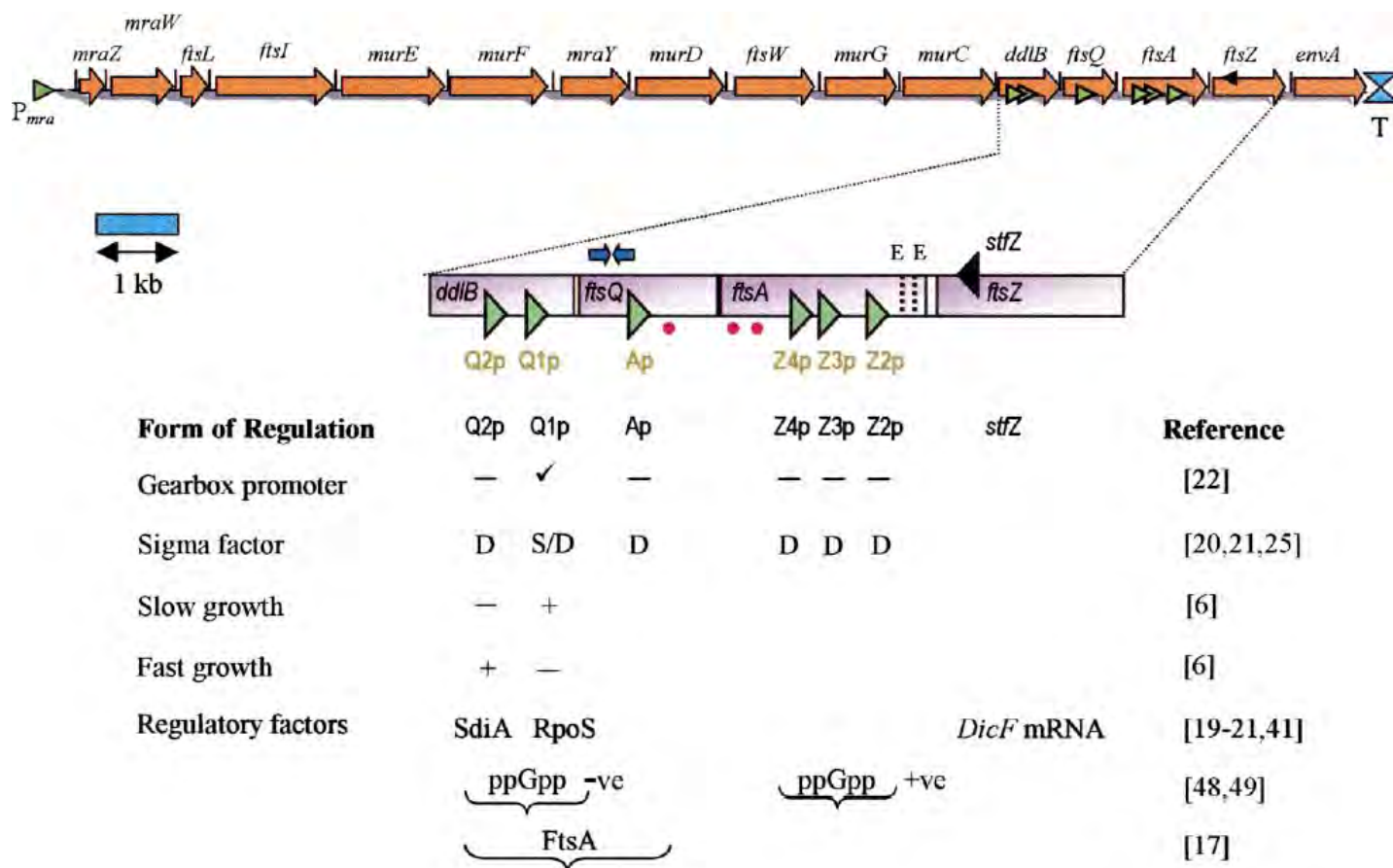


Рис.10.5. *dcw* (*mra*) оперон генов клеточного деления и биосинтеза пептидогликана *Escherichia coli*

Сильный промотор расположен в самом начале кластера *dcw*. Этот промотор *mra* необходим для полной экспрессии первых девяти генов, до *ftsW*. Инактивация этого промотора не летальна, если первые девять генов кластера введены в клетку *in trans*, что указывает на присутствие дополнительных промоторов, способных к транскрипции нижележащих генов. Оказывается, однако, что транскрипция всех нижележащих генов, включая *ftsZ*, уменьшена, если этот (*mra*) промотор инактивирован.

Хотя промотор *mra*, вероятно, важен для нормальной транскрипции всех генов в кластере *dcw*, дополнительные промоторы в пределах кластера также важны и были фактически охарактеризованы первыми. Из-за очевидной значимости *ftsZ* в клеточном делении регуляция его транскрипции была изучена наиболее экстенсивно. Гену предшествует набор промоторов различной силы и типов, что, вероятно, отражает потребность настройки экспрессии гена в различных условиях. Первоначально основная роль в транскрипции *ftsZ* была приписана его двум проксимальным промоторам. Однако позже было показано, что наиболее сильный из этих "промоторов" на самом деле является сайтом процессинга для РНКазы E. Когда это было принято во внимание, оказалось, что почти половина транскриптов *ftsZ* происходила от двух промоторов в пределах *ddlB*. Однако позже было показано, что еще более сильный промотор расположен выше и две трети транскриптов начинаются перед *ddlB*. Это коррелирует с более ранним наблюдением, что более чем 6 т.н.п. перед *ftsZ* требуются для его нормальной экспрессии.

Регуляция экспрессии *ftsZ* с его проксимальных промоторов оказывается важной для надлежащего функционирования аппарата деления (Рис. 10.6). Вставка управляемого *tac* промотора непосредственно перед *ftsZ* вела к заметным изменениям нормального цикла деления, хотя клетки остались жизнеспособными. Это может указывать на то, что нормальный промотор *ftsZ* так или иначе регулирует транскрипцию гена в течение клеточного цикла (результат этой регуляции может максимизировать число жизнеспособных клеток на единицу массы). Эта возможность поддерживается колебанием количества транскрипта *ftsZ* в синхронизированных клетках. Также наблюдалось изменение в количестве транскрипта *ftsZ*, но приписывали их временному ингибированию транскрипции после репликации этой хромосомной области. Транскрипция, начинающаяся перед *ftsA*, показала периодичность и составляла существенную пропорцию транскриптов, захватывающих FtsZ, в то время как проксимальный промотор *ftsZ* транскрибировался конститутивно в течение всего клеточного цикла.

Хотя эти сообщения о колеблющихся уровнях транскрипта в течение клеточного цикла обеспечивают возможную связь между регуляцией генной экспрессии и инициацией клеточного деления, неизвестно, как уровни транскрипта управляются, т.е. какие белки и промоторы являются ответственными за эти колебания. С другой стороны, регуляция транскрипции, начинающейся с двух промоторов, расположенных в пределах *ddlB*, была изучена более подробно.

sdiA ген (*suppressor of division inhibition*) был изолирован по его способности супрессировать действие нескольких ингибиторов деления. Будучи сверхэкспрессированным, его продукт индуцировал формирование мини-клеток и позволял мутанту *ftsZ84* делиться при непермиссивной температуре. Эти эффекты наблюдались из-за того, что белок SdiA активировал транскрипцию с одного из промоторов в *ddlB* перед *ftsQAZ* и *envA* генами.

Значение этой активации не ясно, поскольку ген не является жизненно необходимым. Однако ген может играть роль в стационарной фазе, потому что белок имеет обширную гомологию с большим семейством LuxR-подобных транскрипционных активаторов "quorum sensing" семейства. Все известные активаторы этого семейства работают в паре с другим геном (гомологичным *luxI*), чьей функцией является продукция маленькой свободно диффундирующей молекулы, N-ацил-гомосеринлактона, с ацил-цепью, длина которой варьирует у

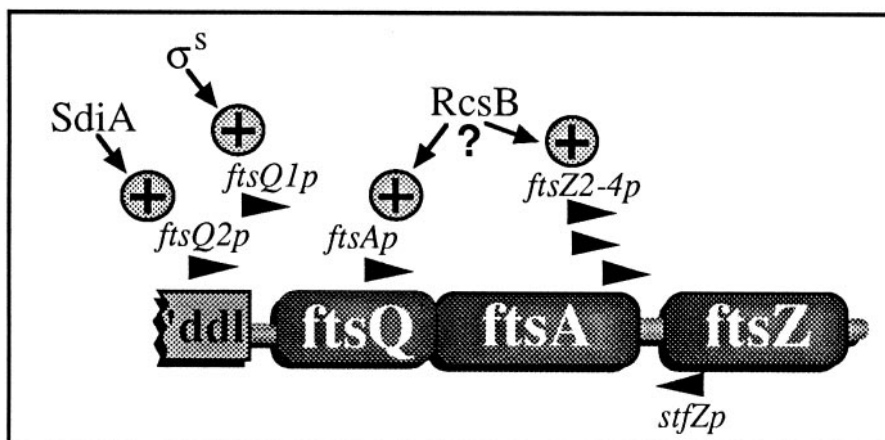


Рис.10.6. Регуляция экспрессии проксимальных промоторов *ftsZ* у *Escherichia coli*

различных видов. Поскольку эта молекула накапливается при увеличении плотности клеток в популяции, *luxR*-подобный ген активирует транскрипцию соответствующего регулона. Интересно, что *E. coli* явно не имеет гомолога *luxI*, что поднимает вопрос: что действует как активатор SdiA? Две противоречивых работы рассматривали эту проблему. Не было найдено никакого доказательства эффекта предполагаемого автоиндуктора на регуляцию SdiA-зависимого промотора (*ftsQp2*). Фактически, они наблюдали небольшое (30-35%) уменьшение транскрипции с этого промотора в течение роста в "культивированной" среде, в которой предварительно выращивались клетки *E. coli*. Этот эффект был меньше, чем снижение транскрипции с того же самого промотора (40-60%) в результате инсерционной инактивации гена *sdiA*. Вопреки этому сообщению, позднее было продемонстрировано не только увеличение транскрипции с *ftsQp2* промотора в стационарной фазе, но также и активацию этого промотора автоиндукторами *V. fischeri* и *V. harveyi*, так же, как "культивированной" средой. Это свидетельствует в пользу того, что *sdiA* действительно действует подобно другим *luxR*-подобным регуляторам, хотя нативная молекула автоиндуктора в *E. coli* остается неизвестной.

rpoS ген, кодирующий сигма-фактор стационарной фазы, также вовлечен в регуляцию транскрипции *ftsQAZ* генов. В частности *ftsQp1*, один из нескольких промоторов, ответственных за транскрипцию *ftsQAZ* генов, но никакой другой промотор в *ddlB-ftsZ* области, зависит от RpoS.

stfZ - маленький ген, транскрибирующийся с антисмысловой цепи в 5' области *ftsZ*. Присутствие промоторной активности и функционального терминатора в этой области было показано, а ингибирование клеточного деления при повышенных температурах, когда эта область ДНК присутствует в множественных копиях, вело к предложению, что она действует как антисмысловая РНК, блокирующая трансляцию *ftsZ* подобно реликтовому фаговому гену *dicF*.

Посттранскрипционная регуляция.

Хотя многие, если не все, гены в кластере *mra* транслируются с полицистронных мРНК, относительная эффективность трансляции различных ORF изменяется значительно. Это неудивительно, поскольку продукты различных генов клеточного деления присутствуют в клетке в весьма различных количествах. FtsZ является, вероятно, наиболее распространенным (до 20,000 молекул в клетку), а FtsQ - одним из наименее распространенных. Несколько ORF в этой области не имеют хороших рибосомсвязывающих сайтов и, кроме того, несколько генов имеют отличные от ATG старт-кодона. Это подразумевало, что трансляция различных ORF в этой области должна демонстрировать существенные различия в эффективности, и это действительно имеет место.

Другой важный аспект посттранскрипционного контроля клеточного деления - ингибирование деления в течение SOS ответа. Повреждение ДНК в *E. coli* индуцирует экспрессию нескольких генов, которые исполняют две функции, важные для выживания клетки. Некоторые из индуцируемых белков вовлечены в восстановление ДНК, но функция других заключается в том, чтобы задержать клеточное деление, пока ДНК не восстановлена. SOS-индуцированный блок деления является результатом действия белка SulA.

Продукт гена *sulA* (*sfiA*) блокирует деление, предотвращая сборку Z-кольца. Использование дрожжевой двухгибридной системы показало прямое взаимодействие SulA с FtsZ. Было также показано, что SulA предотвращает полимеризацию FtsZ *in vitro*. Поскольку сборка кольца FtsZ - ключ к целому процессу деления, индукция SulA полностью блокирует деление. Как только SOS индукция закончена, SulA быстро деградируется протеазой Lon, и деление возобновляется.

FtsK также вовлечен в SOS ответ. Одна из предложенных функций этого белка должна гарантировать, что хромосомы не "защемляются" закрывающейся септой. Инактивация только цитоплазматической части FtsK позволяет продолжаться делению клетки, но индуцирует SOS ответ, возможно из-за последующего повреждения ДНК.

10.2. Регуляция клеточного цикла у *Caulobacter crescentus*.

Бактерия *Caulobacter crescentus* интересна в плане изучения клеточного цикла потому, что, по крайней мере на первый взгляд, клеточный цикл этой бактерии наиболее близок к эукариотическому: имеются четко выраженные G1, S и G2 периоды (у прокариот сложно пока говорить о M фазе); более

того, в результате деления образуются неравноценные клетки (т.е. наблюдается некоторая дифференцировка) – одна из дочерних клеток имеет жгутик и аппарат хемотаксиса, а другая неподвижна и остается прикрепленной к субстрату (Рис. 10.7).

В подвижной клетке репликация ДНК и деление клетки полностью заблокированы (т.е. имеет место четко выраженная G1 фаза клеточного цикла, которой не наблюдается у быстро растущих энтеробактерий). Через некоторое время бактерия утрачивает свой единственный полярный жгутик (а вместе с ним и аппарат хемотаксиса) и на этом же полюсе клетки формирует стебелек, которым прикрепляется к субстрату. Такое морфологическое изменение совпадает с инициацией репликации ДНК (началом S фазы). Во время этой фазы прикрепленная к субстрату клетка удлиняется и формирует новый жгутик на полюсе клетки, противоположном стебельку. По завершении репликации ДНК хромосомы перемещаются к полюсам (фаза G2), за чем следует деление клетки. Таким образом, в каждом цикле деления два типа морфологически и физиологически различных типа клеток сменяют друг друга: подвижная неспособная делиться клетка и неподвижная (прикрепленная) способная к росту и делению. Очевидно, что такая четкая смена поведения клеток должна строго контролироваться, и некоторая информация об этом контроле имеется.

Центральным регулятором клеточного цикла является белок CtrA, принадлежащий к уже хорошо нам знакомому классу регуляторов ответа. Этот белок контролирует синтез жгутиков, метилирование ДНК и ее репликацию, деление клетки (Рис. 10.8).

Контроль репликации ДНК осуществляется путем ее метилирования. CtrA активирует транскрипцию гена *ccrM*, кодирующего ДНК-метилтрансферазу, жизненно необходимую для роста *C. crescentus*. Транскрипция этого гена происходит исключительно в фазе G2 клеточного цикла, а поскольку белок CcrM очень быстро деградирует протеазой Lon, то и присутствует в значимых количествах он только в период своего активного синтеза, т. е. в фазе G2. В результате вновь реплицированные хромосомы находятся в полуметилированном состоянии значительную часть клеточного цикла (фактически всю S фазу). А поскольку для инициации репликации ДНК должна быть в полностью метилированном состоянии, новый раунд репликации ДНК у *C. crescentus*, в отличие от *E. coli*, не может начаться, пока не завершится предыдущий.

CtrA также обеспечивает временной контроль за экспрессией генов клеточного деления. С одной стороны, CtrA репрессирует транскрипцию *ftsZ* в подвижных клетках, а с другой – активирует транскрипцию *ftsQA* оперона в клетках перед самым делением. Таким образом CtrA обеспечивает

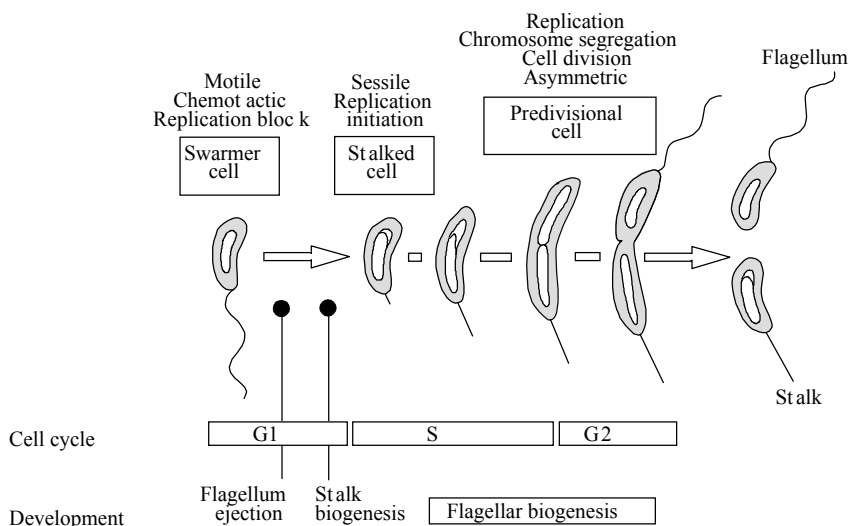


Рис.10.7. Клеточный цикл *Caulobacter crescentus*

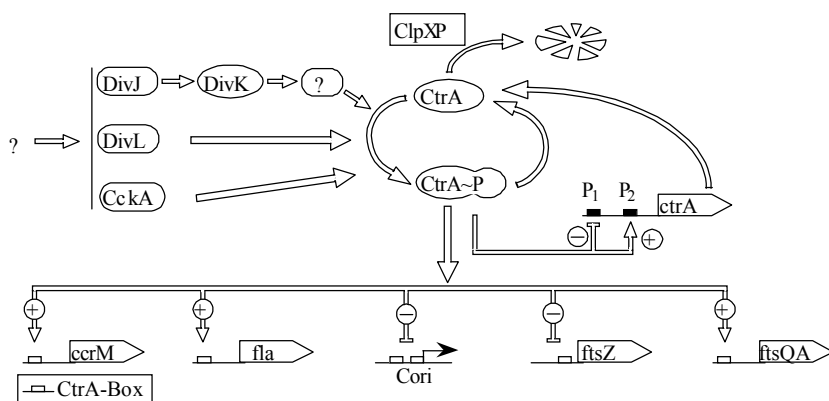


Рис.10.8. Основные регуляторы клеточного цикла *Caulobacter crescentus*

последовательную транскрипцию сначала *ftsZ*, а затем *ftsQA*. Такая последовательность экспрессии соответствует предполагаемому порядку сборки машины клеточного деления (дивисомы) в центре делящейся клетки.

Но наиболее важным, пожалуй, в плане контроля клеточного цикла, является негативная регуляция при помощи CtrA сильного промотора P_{Cori} , расположенного внутри точки начала репликации хромосомы (Cori). Активность этого промотора абсолютно необходима для инициации репликации ДНК. Минимальный Cori содержит 5 CtrA-боксов (сайтов связывания CtrA), два из которых перекрываются с областью P_{Cori} . Каким-то образом CtrA блокирует транскрипцию с промотора P_{Cori} , а значит, и репликацию хромосомы, во всех клетках за исключением только что сбросивших жгутик и закрепившихся на субстрате (т.е. репрессия не срабатывает как раз в тех клетках, в которых и начинается репликация ДНК).

Возможность использовать всего один регуляторный белок для регуляции совершенно разных функций на протяжении клеточного цикла достигается за счет строгого временного и пространственного контроля активности CtrA. Как и большинство других регуляторов ответа, CtrA активен только в фосфорилированном состоянии. Но в таком состоянии этот белок присутствует только в подвижных клетках и непосредственно перед делением (в G2 фазе). Это достигается путем частично перекрывающихся механизмов, контролирующих CtrA на уровне экспрессии, стабильности и фосфорилирования.

Транскрипция *ctrA* происходит только перед делением, после инициации репликации хромосомы. Транскрипция происходит с двух промоторов – слабого P_1 , активного только в ранних "предивизионных" клетках и сильного P_2 , включающегося позже. CtrA регулирует оба промотора, причем первый репрессирует, а второй активирует. Таким образом, по мере накопления фосфорилированного CtrA в ранней предивизионной клетке P_1 отключается, а P_2 , наоборот, активируется, что дает высокую концентрацию CtrA к концу S фазы. Такой простой авторегуляторный механизм создает основу для обеспечения нужных концентраций CtrA в соответствующее время. От последовательного изменения концентраций CtrA зависит, в свою очередь, последовательность экспрессии контролируемых этим регулятором генов. Так, аффинность CtrA к жгутиковому промотору *fliQ* в 20 раз выше, чем к промотору *ccrM*, поэтому *fliQ*, так же как и другие зависящие от CtrA жгутиковые промоторы, транскрибируется в ранней предивизионной клетке, а *ccrM* активируется значительно позже, когда концентрация CtrA возрастает.

Для того, чтобы "перезапустить таймер" в новом клеточном цикле, достаточно просто вовремя удалить CtrA из клетки. И такое удаление действительно имеет место – CtrA протеолитически деградируется в поздней предивизионной клетке и во время прикрепления подвижной клетки к субстрату. Удаление активного CtrA до того, как клетка вступит в S-фазу, важно не только для авторегуляции CtrA, но и для активации промотора P_{Cori} и инициации репликации. Деградация CtrA происходит под действием АТФ-зависимой протеазы ClpXP. Причем, в отличие от *E. coli*, инактивация этой протеазы у *Caulobacter* является летальной – клетка оказывается "арестованной" в фазе G1 клеточного цикла. Однако каким образом "включается" и "выключается" протеолиз – пока неясно.

Активность CtrA регулируется сразу через несколько путей фосфорилирования. Как известно, регуляторы ответа (к числу каковых принадлежит и CtrA) активируются путем фосфорилирования сенсорными гистидинкиназами в ответ на сигналы внешней среды. Вновь синтезированный CtrA немедленно фосфорилируется, и как минимум три гистидинкиназы (DivJ, DivL и CskA) могут участвовать в этом процессе. К сожалению, сигналы, на которые реагируют эти киназы, неизвестны. Однако известно, что две из этих киназ, DivJ и CskA, локализуются в различных частях клетки, что свидетельствует в пользу участия пространственной информации в контроле активации CtrA. Так, CskA, типичная мембранная сенсорная киназа, распределена равномерно на протяжении большей части клеточного цикла. Однако в ранней предивизионной клетке CskA концентрируется на полюсе клетки, противоположном стебельку и остается там до момента деления. Полярная локализация абсолютно необходима для проявления киназной активности CskA и фосфорилирования CtrA. DivJ концентрируется на противоположном (стебельковом) полюсе во время перехода от G1 к S фазе. Таким образом, очевидно, что активность CtrA контролируется, по крайней мере частично, различной природой противоположных полюсов клетки. Каждый вновь сформированный при делении полюс клетки сначала "жгутиковый", а затем становится "стебельковым". Полюса фактически "маркируются" в процессе развития различными киназами, от активности которых, в свою очередь, зависит активность

Литература:

1. Magne Østerås and Urs Jenal. Regulatory circuits in *Caulobacter*. *Current Opinion in Microbiology* 2000, 3:171–176
2. Christine Jacobs and Lucy Shapiro. Microbial asymmetric cell division: localization of cell fate determinants. *Current Opinion in Genetics & Development* 1998, 8:386–391 (less detail but better text overall)
3. J. Lutkenhaus. The regulation of bacterial cell division: a time and place for it. *Current Opinion in Microbiology* 1998, 1:210–215
4. J. A. Hoch. Initiation of bacterial development. *Current Opinion in Microbiology* 1998, 1:170–174

11. Споруляция у *Bacillus subtilis*.

Процесс споруляции у *B. subtilis* проходит через серию четко выраженных морфологических стадий, и его результатом является превращение растущей клетки в двухкамерный спорангий, в котором и формируется спора. Известно более 125 генов, участвующих в этом процессе. Их транскрипция контролируется во времени и пространстве четырьмя ДНК-связывающими белками и пятью сигма факторами, а сигнал для запуска всего процесса поступает от сенсорных систем и путем переноса фосфатной группы по сложной фосфотрансляционной сети оказывается на одном ключевом регуляторе ответа, который и запускает каскадную экспрессию громоздкого аппарата споруляции.

Морфология споруляции

Последовательные морфологические стадии споруляции показаны на рисунке 11.1.

Начало споруляции обнаруживается по формированию т. н. аксиального филамента, в котором две хромосомы после последнего раунда репликации вытягиваются вдоль длинной оси клетки. Затем возле одного из полюсов клетки формируется перегородка (септа), что разделяет развивающийся спорангий на два компартмента, материнскую клетку (больший) и преспору. Каждый из этих компартментов получает по копии хромосомы. На последующих стадиях споруляции преспора обволакивается материнской клеткой и в конце концов оказывается полностью внутри нее (в связи с чем и называется эндоспорой).

На последующих стадиях преспора созревает в результате сложных биосинтетических и морфогенных процессов, протекающих в обоих компартментах. Через 6-8 часов созревание заканчивается, и зрелая спора освобождается путем лизиса материнской клетки. Последовательность морфологических событий разделяется на стадии, которые обозначаются римскими цифрами 0-VII. Стадия 0 соответствует клеткам, еще не ставшим на путь споруляции, стадия I - начавшим споруляцию и сформировавшим аксиальный филамент, стадии II и III соответствуют спорангиям на стадиях полярного деления и обволакивания преспоры материнской клеткой и т.д. Похожая схема используется для обозначения генов и оперонов, необходимых для споруляции. Так,

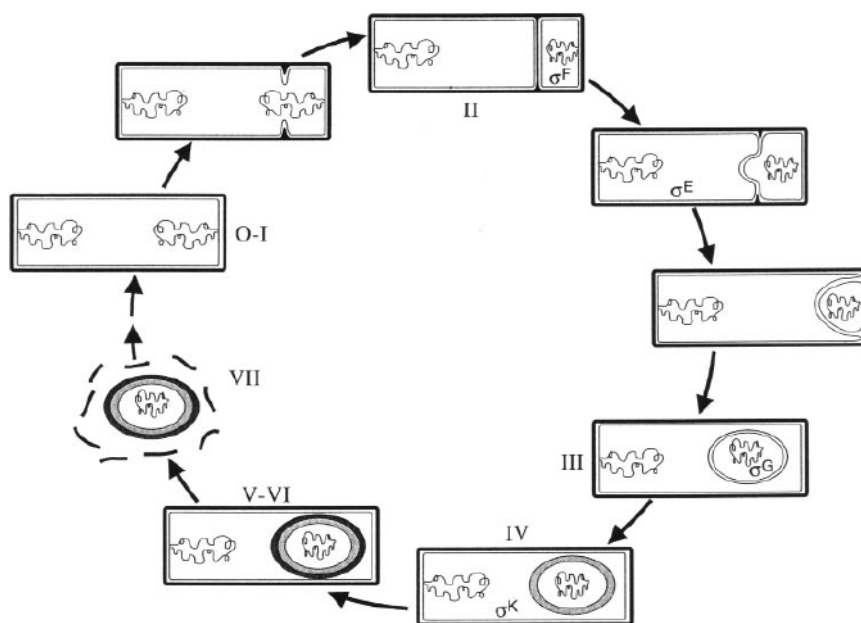


Рис.11.1. Стадии споруляции *Bacillus subtilis*

мутации в генах *spo0* и *spoIII* останавливают споруляцию на стадиях 0 и III соответственно. Латинские буквы различают гены одной стадии между собой (напр., *spo0A* и *spo0B*). В оперонах дополнительные латинские буквы используются для того, чтобы различать членов оперонов между собой (напр., *spoIIAA*, *spoIIAB* и *spoIIAC*).

Как принимается решение о начале споруляции?

Бактерии достаточно сложно принять решение о начале споруляции, поскольку этот процесс, будучи запущенным, уже необратим. А поскольку это решение коренным образом меняет метаболизм клетки, ошибка может иметь для нее печальные последствия. Поэтому для принятия этого решения бактерия должна проанализировать множество сигналов от внешней среды от внутриклеточных метаболических систем, от клеточного цикла. Сигналы могут происходить от нехватки питательных веществ, плотности популяции, синтеза ДНК, повреждений ДНК, цикла Кребса. Все эти сигналы интегрируются на уровне одного регуляторного белка (*Spo0A*). Сигналы передаются на *Spo0A* в виде его фосфорилирования через цепь переносчиков фосфата. *Spo0A* принадлежит к классу регуляторов ответа из семейства двухкомпонентных регуляторных систем, которые вам уже хорошо знакомы. И той информации, которой вы уже обладаете, наверное, достаточно, чтобы сделать вывод о том, что в данном случае сложно будет обойтись простой двухкомпонентной системой. И действительно, основу регуляторной системы споруляции составляет сложная разветвленная фосфотрансляционная сеть. В качестве источника сигнала могут выступать несколько сенсорных белков (гистидинкиназ), сигнал от которых (фосфат) поступает на ключевой регулятор через несколько переносчиков. Такая сложная система создает много точек, в которых можно осуществлять контроль передачи сигнала, что позволяет тесно координировать многие клеточные события. Поэтому практически каждая стадия передачи сигнала по фосфотрансляционной сети в той или иной степени подвержена регуляции.

Фосфат в сигнальную фосфотрансляционную систему поступает от двух сенсорных киназ, цитоплазматической *KinA* и мембранной *KinB*, а в качестве получателей этого фосфата выступают два РО. Первый из них, *Spo0F* непосредственно фосфорилируется киназами, тогда как фосфат на второй РО, *Spo0A*, попадает от *Spo0F* через переносчик *Spo0B*. *Spo0A~Ф* является транскрипционным фактором и выступает в роли репрессора либо активатора по отношению к тем генам, чьи функции являются критическими при переключении клетки с вегетативного роста на споруляцию. Один из таких генов кодирует репрессор *AbiB*, который предотвращает экспрессию ряда генов, необходимых при переключении на споруляцию. Накопление *Spo0A~Ф* в клетке снижает уровень *AbiB* и активирует ранние гены споруляции. Кроме того, *Spo0A~Ф* является непосредственным активатором генов и оперонов, таких как *spoIIA* и *spoIIG*, кодирующих сигма факторы σ^F и σ^E , ответственные за локальную экспрессию генов споруляции

соответственно в преспоре и материнской клетке.

Первый уровень контроля осуществляется, естественно, на уровне киназ. К сожалению, эффекторные молекулы, активирующие эти киназы, пока не известны, однако описан ингибитор киназной активности белка *KinA*. Активность этого ингибитора, *KipI*, контролируется анти-ингибитором *KipA*, ген которого находится в одном опероне с *kipI*.

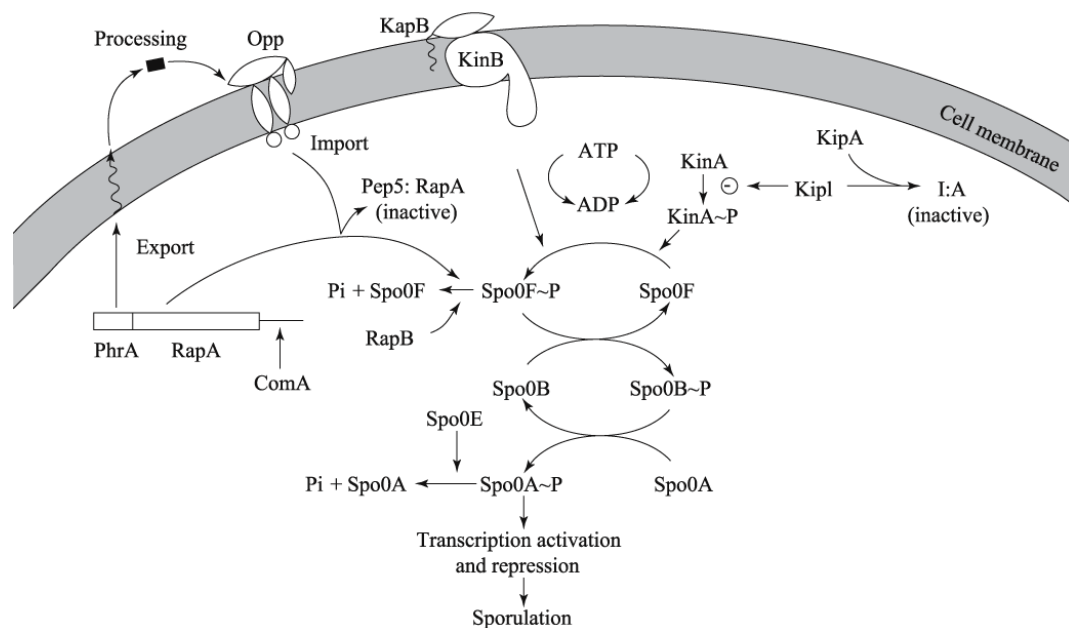


Рис.11.1. Контроль инициации споруляции у *Bacillus subtilis*

Этот оперон реагирует на доступность глюкозы и фиксированного азота, что позволяет запускать процесс споруляции при голодании по этим компонентам питания.

Следующий уровень контроля осуществляют аспартил-фосфат фосфатазы, которые удаляют фосфат с молекул PO фосфотрансляционной цепи. Первой была обнаружена фосфатаза Spo0E, действующая непосредственно на Spo0A~Ф. К сожалению, до сих пор очень мало информации о том, как регулируется активность или синтез самой Spo0E. Несколько больше известно о фосфатазах, действующих на более ранних этапах сигнального пути. Фосфатазы RapA и RapB действуют на Spo0F~Ф. А поскольку все реакции по пути от Spo0F~Ф к Spo0A~Ф являются обратимыми, дефосфорилирование Spo0F ведет к быстрому дефосфорилированию и Spo0A.

RapA и RapB регулируются на уровне транскрипции физиологическими процессами, которые составляют альтернативу споруляции. RapA находится под контролем сигнальной системы ComP/ComA, ответственной за индукцию состояния компетентности к поглощению ДНК (физиологическое состояние, несовместимое со споруляцией). А RapB индуцируется условиями, способствующими вегетативному росту клетки, что позволяет при инициации деления или других клеточных процессов, несовместимых со споруляцией, предотвращать это переключение метаболизма путем специфического дефосфорилирования одного компонента фосфотрансляционной цепи.

Еще одна ступень контроля – регуляция регуляторов Spo0A (который тоже является регулятором). Здесь одним из регуляторов является система контроля плотности бактериальной популяции, зависящая от пептидного феромона – продукта гена *phrA*. Ген этот находится в одном опероне с RapA, а его продуктом является небольшой (всего из 44 АК) белок. На аминоконце белка располагается типичная сигнальная последовательность, и белок действительно секретируется из клетки по SecA-зависимому пути. После отрезания сигнального пептида от белка остается всего 19 АК. Оказалось, что этот пептид, а точнее, только пять карбокси-концевых АК, ингибирует фосфатазную активность RapA. Для этого ингибирования необходима активная система транспорта олигопептидов в клетку Opp, компоненты которой и отрезают необходимые 5 АК с карбокси-конца 19АК пептида и транспортируют их в клетку. Такая достаточно громоздкая система может выполнять несколько функций. Во-первых, синтез, секреция и реимпорт PhrA пептида требует времени, поэтому эта система задерживает споруляцию, когда все для нее уже готово. Во-вторых, вся эта система очень напоминает способ межклеточных коммуникаций при помощи низкомолекулярных молекул-феромонов. Поэтому еще одной возможной функцией PhrA может быть детекция плотности бактериальной популяции, во всяком случае, при высокой плотности задержка будет явно меньше.

Роль активаторов транскрипции на разных стадиях споруляции

Будучи активированным путем фосфорилирования, Spo0A индуцирует транскрипцию как минимум семи генов, управляющих вступлением бактерии на путь споруляции и превращением вегетативной клетки в двухкомнатный спорангий. Spo0A~P активирует транскрипцию, связываясь с промоторами соответствующих генов и оперонов, контактируя с РНК-полимеразой, имеющей в своем составе основной сигма фактор σ^A или альтернативный σ^H . σ^H обеспечивает транскрипцию неизвестного пока гена (или генов), контролирующего полярное деление.

После разделения клетки на две части в каждом из образовавшихся компартментов происходит активация компартмент-специфического сигма-фактора - σ^F в преспоре и σ^E в материнской клетке. σ^F синтезируется задолго до полярного деления, и то, что его активность проявляется только в преспоровом компартменте, определяется регуляцией на

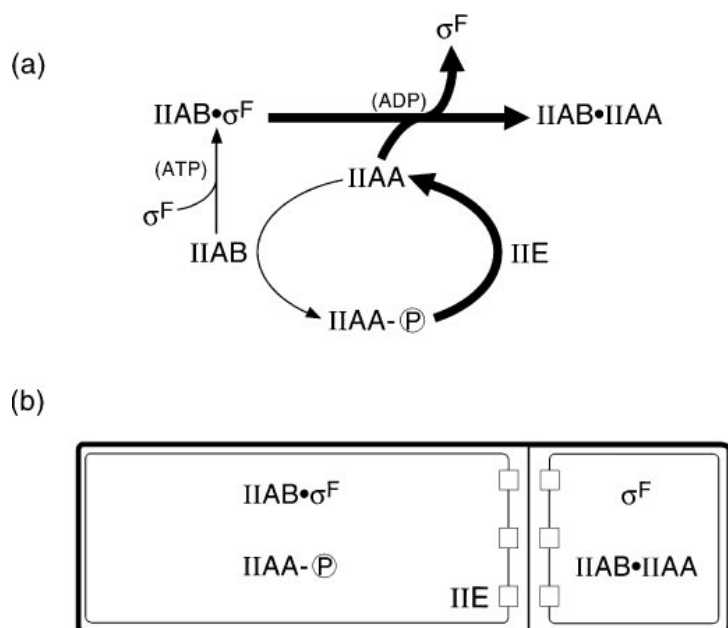


Рис.11.2. Активация σ^F в преспоре

уровне активности белка. Эта регуляция осуществляется тремя белками, SpoII^E, SpoIIAB и SpoIIAA. Как и σ^F , эти белки синтезируются в исходной клетке еще до ее полярного деления. SpoIIAB является анти-сигма фактором, который связывается с σ^F и ингибирует транскрипцию с его участием. SpoIIAA - анти-анти сигма фактор, который противодействует эффекту SpoIIAB, связываясь с комплексом SpoIIAB- σ^F и вызывая освобождение активного σ^F . SpoIIAB является также киназой, фосфорилирующей SpoIIAA, предотвращая его связывание с собой. Таким образом, до образования септы σ^F находится в комплексе с SpoIIAB, то есть является инактивированным, а SpoIIAA фосфорилирован и поэтому не может освободить σ^F . После образования перегородки в действие вступает еще один фермент, SpoII^E, являющийся фосфатазой, специфически дефосфорилирующей SpoIIAA~P. SpoII^E является интегральным мембранным белком, локализованным в перегородке между двумя компартментами. Белок приблизительно одинаково экспонируется в обе стороны от перегородки, в связи с чем можно ожидать, что дефосфорилирование SpoIIAA~P будет идти с одинаковой скоростью в обоих компартментах. Но поскольку объем преспоры в 5-7 раз меньше объема материнской клетки, концентрация дефосфорилированного SpoIIAA в преспоре будет в несколько раз выше, следовательно, в этом компартменте σ^F будет активирован раньше (Рис. 11.2).

Вскоре после активации σ^F в преспоровом компартменте происходит активация другого сигма-фактора, σ^E , но теперь уже в материнской клетке (Рис. 11.3а). Так же, как и σ^F , σ^E присутствует в обоих компартментах спорангия. Этот сигма-фактор необычен тем, что синтезируется в форме неактивного предшественника, пре- σ^E . Синтез пре- σ^E начинается до полярного деления путем индукции транскрипции оперона *spoIIIG* уже знакомым вам активатором транскрипции Spo0A~P. Собственно пре- σ^E кодируется вторым геном оперона, *spoIIGB*, а первый ген, *spoIIGA*, необходим для процессинга пре- σ^E в зрелый белок. Продукт еще одного гена, *spoIIR*, необходим для процессинга пре- σ^E , и транскрипция этого гена зависит от σ^F . Таким образом, появление σ^E в материнской клетке привязано к отделению преспоры перегородкой, поскольку транскрипция зависимых от σ^F генов происходит только в преспоровом компартменте. (SpoIIR должен активировать σ^E и в преспоре, но здесь σ^E по неизвестной причине очень быстро деградирует.)

Что же контролируют два новых сигма-фактора? В σ^E регулон входят гены, разрушающие пептидогликан септы, отделяющей преспору от материнской клетки, а гены, контролируемые σ^F , отвечают за обволакивание преспоры материнской клеткой. К моменту окончания поглощения преспоры материнской клеткой в преспоре начинается транскрипция нового гена, *spoIIIG*, кодирующего еще один сигма-фактор, σ^G . Этот сигма-фактор активирует транскрипцию поздних генов преспоры, необходимых для завершения процесса споруляции. Промотор, с которого считывается σ^G , опознается ранним преспоровым сигма-фактором σ^F , но для его активации необходим неизвестный пока фактор, транскрибируемый с σ^E промотора материнской клетки.

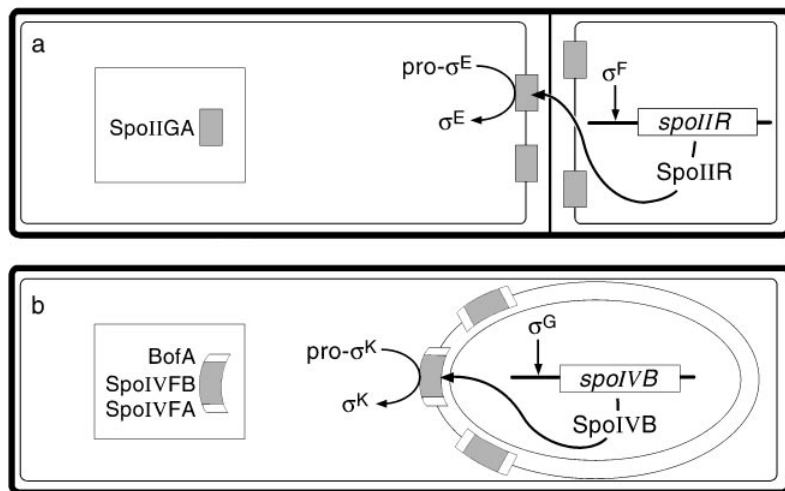


Рис.11.3. Активация σ^E и σ^K в материнской клетке

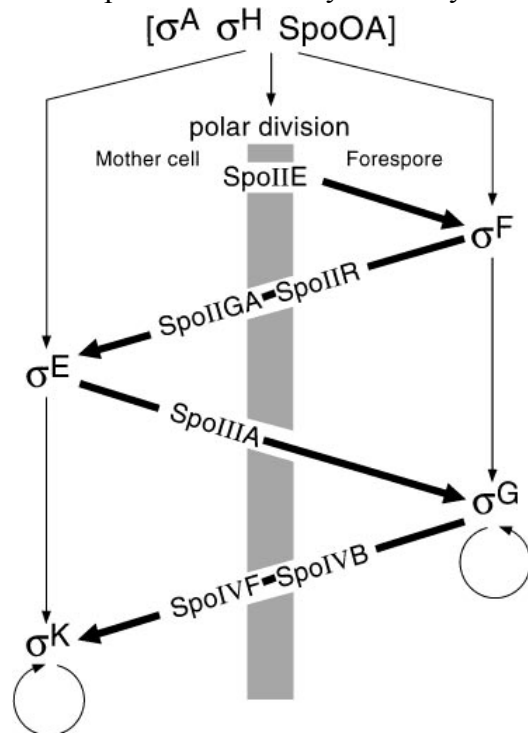


Рис.11.4. Последовательная активация сигма-факторов при споруляции

(SpoVT и самые поздние преспоровые гены)

Экспрессия поздних генов в материнской клетке находится под контролем сигма-фактора σ^K (Рис. 11.3b). Как и ранний сигма-фактор материнской клетки, σ^E , σ^K синтезируется в виде неактивного предшественника пре- σ^K , который превращается в активную форму после протеолитического отщепления аминоконцевой последовательности из 20 АК остатков. Протеолитическое расщепление пре- σ^K осуществляется одним из членов σ^E регулона, SpoIVFA, для активации которого необходим продукт гена *spoIVB*, транскрибируемого с σ^G промотора в преспоровом компартменте.

Экспрессия двух сигма-факторов в материнской клетке запускает последовательную цепь регуляторных событий, ведущую к поочередной активации и инактивации комплекса генов, результатом работы которого является синтез спорных покровов, кортекса и внешней оболочки споры (Рис 11.4).

1. R. Losick

2. M. Perego. Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. Trends in Microbiology. 1998. 6:366-370

Хороший обзор начальных стадий регуляции споруляции с упором на роль фосфотрансляционной системы.

12. Межклеточные коммуникации. Quorum sensing

Дабы преуспеть, бактерии должны быть приспособлены к выживанию и существованию в сложных микробных сообществах. Взаимодействия между микроорганизмами в таких сообществах, равно как и между патогенными микроорганизмами и их хозяевами зависят от экспрессии специфических генов, участвующих в этих взаимодействиях. Не удивительно, что бактерии выработали механизмы детекции конкурентов и растительных либо животных хозяев и системы "быстрого реагирования" на подобные контакты. Во многих случаях экспрессия определенного набора генов будет зависеть от достижения бактериальной популяцией определенной плотности. Например, путем задержки экспрессии факторов вирулентности до тех пор, пока не будет достигнута высокая плотность популяции, патогены растений могут избегать защитной реакции своих хозяев.

У животных и растений проникающие через мембрану сигнальные молекулы, такие как стероидные и брассиностероидные гормоны, метилжасминат и др., являются хорошо изученными регуляторами развития, дифференциации клеток и метаболизма в целом. В последние годы у бактерий тоже были обнаружены сигнальные молекулы такого рода - ацилированные производные гомосеринлактона (АГСЛ), участвующие в межклеточной коммуникации. Бактерии используют эти молекулы прежде всего для того, чтобы следить за плотностью своей популяции. Этот феномен получил название "Quorum sensing" (чувство кворума). Каждая клетка в популяции продуцирует низкий базальный уровень свободно диффундирующего АГСЛ за счет активности специфического фермента, АГСЛ синтетазы, как правило, члена LuxI-семейства белков. С возрастанием плотности бактериальной популяции концентрация АГСЛ также возрастает. При достаточно высокой плотности, т.е. по достижении кворума, накопленный АГСЛ взаимодействует с рецепторным белком, обычно с членом LuxR-семейства белков-регуляторов транскрипции, которые изменяют уровень экспрессии АГСЛ-зависимых генов. У различных бактерий принцип действия АГСЛ-зависимой регуляции сохраняется, хотя набор регулируемых генов может быть совершенно разным. Первой (в 1970 г.) была описана АГСЛ-сенсорная система морской бактерии *Vibrio fischeri*, где "чувство кворума" регулирует экспрессию генов биолюминесценции (*lux*). У других бактерий тот же механизм регулирует экспрессию генов вирулентности (*Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora*), конъюгационного переноса Т-ДНК (*Agrobacterium tumefaciens*), подвижность (*Serratia liquefaciens*), продукцию антибиотиков (*Erwinia carotovora*) и др (Рис. 12.1).

Когда бактерии *Vibrio fischeri* колонизируют специальные органы некоторых видов рыб и кальмаров, они начинают светиться в результате активации *lux*-оперона, кодирующего фермент -

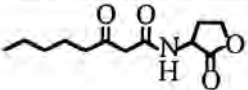
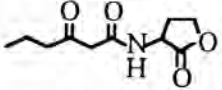
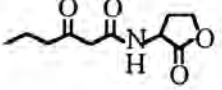
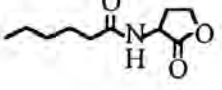
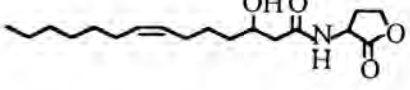
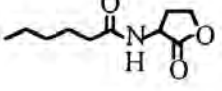
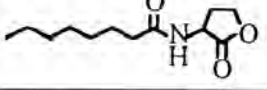
Бактерия	LuxI/LuxR гомолог	Боковая цепь АГСЛ и название	регулируемое свойство
<i>A. tumefaciens</i>	TraI/TraR	 N-3-оксооктаноил (OOHL)	конъюгационный перенос Ti-плазмид
<i>E. carotovora</i>	CarI/CarR/ExpI/ExpR	 N-3-оксогексаноил (OHHL)	Секретируемые факторы вирулентности и карбапенемовые антибиотики
<i>P. stewartii</i>	EsaI/EsaR	 N-3-оксогексаноил (OHHL)	Внеклеточный капсульный полисахарид
<i>P. aureofaciens</i>	PhzI/PhzR	 N-гексаноил (HHL)	Феназины
<i>R. leguminosarum</i>	RhlI/RhlR	 N-3-гидрокси-7-цис-тетрадеканоил (HTDHL)	Взаимодействие с растением и образование клубеньков
<i>R. solanacearum</i>	SolI/SolR	 N-гексаноил (HHL)	aidA?
		 N-октаноил (OHL)	

Рис.12.1 Автоиндукторы грамотрицательных бактерий

люциферазу, непосредственно производящий свечение, и ряд ферментов, определяющих синтез субстрата для люциферазы - алифатического альдегида, энергия окисления которого и расходуется на свечение. Продукт гена *luxI* кодирует синтез АГСЛ, в данном случае *N*-(3-оксогексаноил)-L-гомосеринлактона. Это вещество способно свободно диффундировать во внешнюю среду через бактериальные мембраны. Во время периода несимбиотической жизни *Vibrio fischeri* в морской воде АГСЛ в результате такой диффузии не накапливается в клетке и бактерия не тратит энергию на свечение. С другой стороны, при быстром росте в богатой среде световых органов хозяина, где плотность клеток бактерий достигает 10^{10} на миллилитр, АГСЛ накапливается в бактериальных клетках, приводя к индукции люциферазного оперона.

Самой по себе аккумуляции АГСЛ в клетке недостаточно для активации экспрессии люциферазных генов. Еще один ген, *luxR*, кодирует транскрипционный активатор, который взаимодействует с АГСЛ. Этот белок имеет два четко выраженных домена. Карбокси-концевой содержит НТН мотив, отвечающий за связывание белка с ДНК в специфических симметричных участках, называемых *lux*-боксами. Эти короткие (20 н.п.) последовательности были идентифицированы в промоторных областях многих генов, регулируемых АГСЛ. Амино-концевой домен LuxR взаимодействует с АГСЛ. Предполагается, что в отсутствие АГСЛ С-концевой ДНК-связывающий домен экранируется N-концевым доменом, что предотвращает связывание с ДНК. Связывание АГСЛ N-концевым доменом вызывает конформационное изменение, позволяющее аминоконцевому домену LuxR связаться с *lux*-боксами и активировать транскрипцию.

Интересно, что не все LuxR-подобные белки являются активаторами транскрипции. Белки EsaR и ExpR, продуцируемые растительными патогенами *Pantoea stewartii* и *Erwinia carotovora*, являются репрессорами. Для этих белков связывание АГСЛ снижает их аффинность к *lux*-боксам. Тогда как большинство LuxR-подобных активаторов связывается с *lux*-боксами, перекрывающимися с -35 областью промотора, EsaR связывается в области -10, что, естественно, предотвратит инициацию транскрипции.

Синтез АГСЛ.

АГСЛ имеют общую структуру алифатической цепочки различной длины, присоединенной через амидную связь к лактонизированному остатку гомосерина.

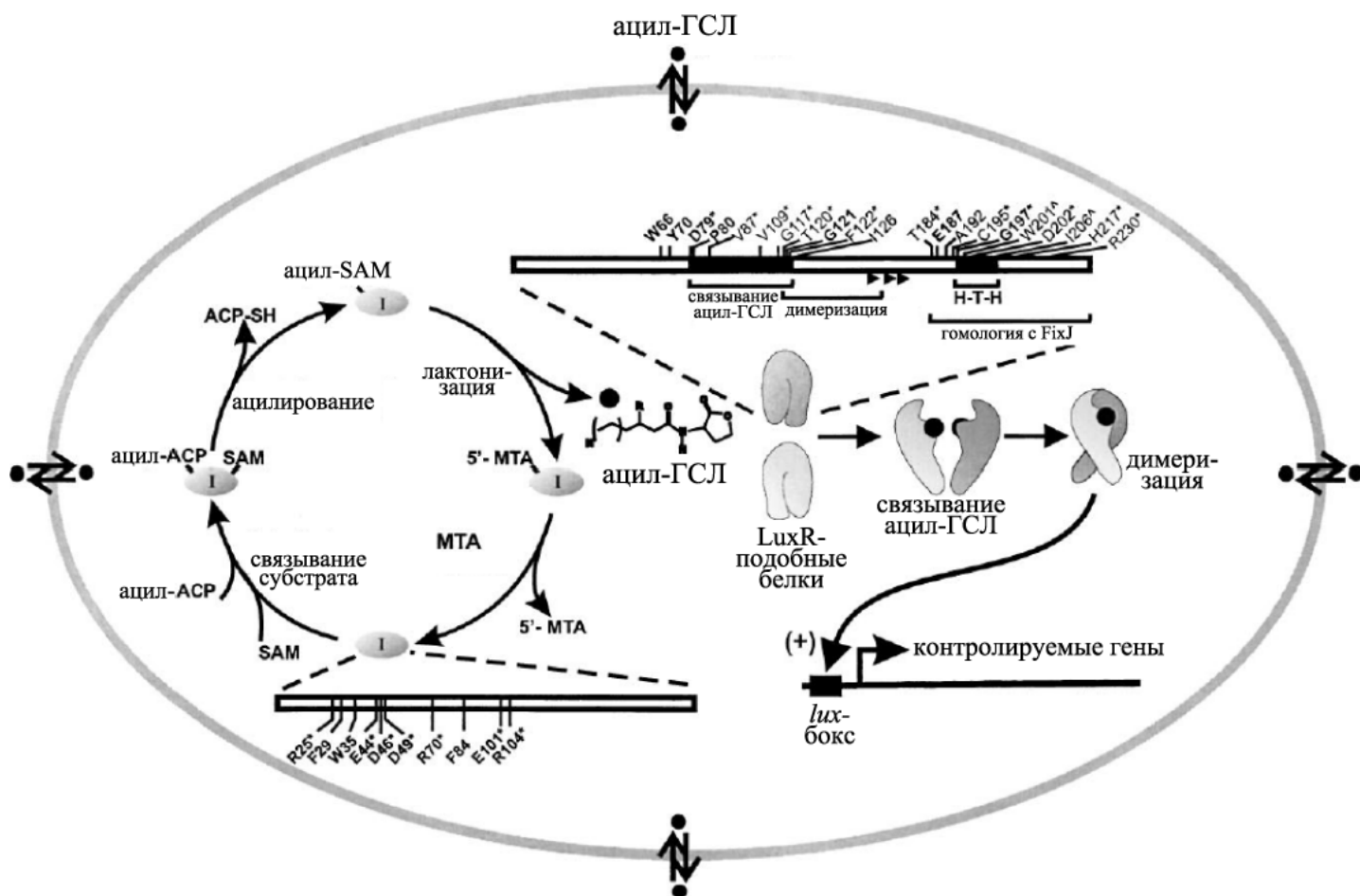


Рис.12.2. Синтез АГСЛ и механизм его действия

LuxI катализирует связывание S-аденозилметионина (SAM) с жирнокислотной цепочкой, синтезированной при участии ацил-ацил переносящего белка (ACP). Последующая за образованием амидной связи лактонизация S-аденозилметионина приводит к образованию кольца, освобождению АГСЛ и образованию побочного продукта - 5-метилтиоаденозина (МТА).

Регуляция синтеза экзоферментов у Erwinia

Фитопатогенные бактерии *Erwinia carotovora* продуцируют довольно широкий спектр гидролитических ферментов, деградирующих клеточные стенки растений. К таким ферментам относятся пектацтиазы, целлюлазы, полигалактуроназы и протеазы. Развитие этого патогена в растениях ведет к индукции этих ферментов, результатом чего является мацерация растительных тканей и развитие симптомов мягкой гнили. Продукция внеклеточных ферментов зависит от накопления N-3-оксогоксаноил-L-гомосерин лактона, синтез которого детерминирован гомологами LuxI, которые у разных штаммов называются ExpI, CarI и HslI. Рядом с геном *expI* находится *expR* - гомолог *luxR*. Мутанты по гену *expI* имеют сниженную, а по гену *expR* - повышенную продукцию экзоферментов.

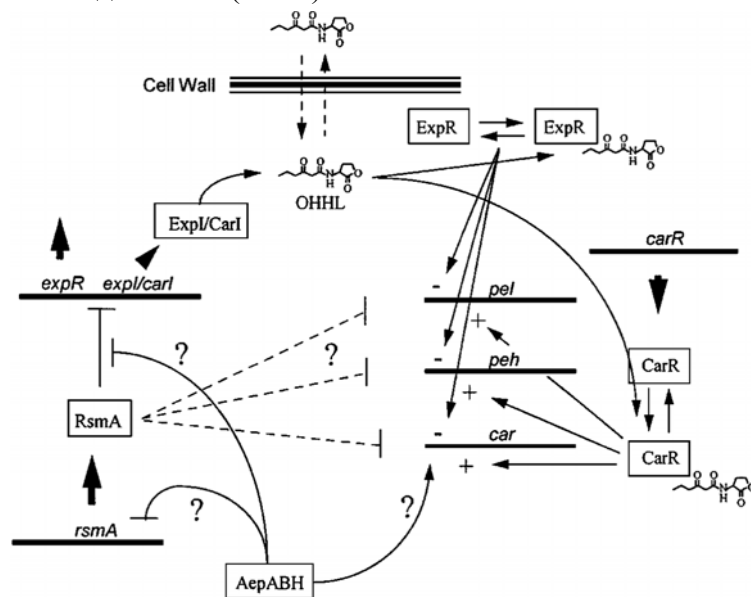


Рис.12.3. Регуляция синтеза факторов вирулентности *Erwinia* посредством АГСЛ

Кроме того, некоторые штаммы *Erwinia carotovora* продуцируют β -лактамы антибиотики широкого спектра действия - карбапенемы. Синтез карбапенемов координирован с экспрессией экзоферментов и может служить для ингибирования других бактерий при конкуренции за питательные вещества, высвобождающиеся при мацерации растительных тканей. Синтез карбапенемов контролируется парой белков CarR и CarI, гомологичных, но не идентичных по своим функциям ExpR и ExpI. CarR и ExpR не взаимозаменяемы, но АГСЛ, продуцируемый CarI, идентичен таковому ExpI. Продукция экзоферментов у *Erwinia* контролируется дополнительно еще несколькими регуляторными системами.

Роль АГСЛ-сигналов в экологии бактериальных популяций. Кросс-сигналы (и ингибирование антибиотиками).

Рассмотренный нами только что способ коммуникаций между бактериальными клетками за счет секретируемых небольших молекул-феромонов достаточно широко распространен в природе, но далеко не всегда молекулярные механизмы, лежащие в его основе, аналогичны только что описанным. Например, грамположительные бактерии вместо АГСЛ используют короткие пептиды в качестве феромонов. Будучи пептидами, эти молекулы не могут свободно проникать через мембраны и поэтому активно секретируются из бактериальной клетки, используя мембранные транспортеры АВС-класса. Пептидные сигналы, естественно, не могут также проникнуть и внутрь клетки-мишени, а посему распознаются снаружи типичной сенсор-киназой, передающей сигнал (в виде фосфогруппы) внутриклеточным регуляторам. Таким образом регулируются компетентность и споруляция у *Bacillus subtilis*, вирулентность у *Staphylococcus aureus*, конъюгация у *Enterococcus faecalis* и продукция микроцина у *Lactobacillus sake*.

Литература:

1. C. Fuqua, M.R. Parsek and E.P. Greenberg. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annu. Rev. Genet. 2001. 35:439–68

13. Секреция белков

Около 20% всех белков, продуцируемых бактериями, локализованы вне цитоплазмы.

Секреция белков за пределы цитоплазмы является важнейшей способностью вирулентных бактерий, поскольку большинство стадий процесса инфекции представляет собой ту или иную форму взаимодействия с внешней средой, и многие белковые продукты должны либо располагаться на внешней поверхности бактерии либо секретироваться во внешнюю среду. Кроме того, секреция белков имеет важнейшее значение для биотехнологии, поскольку очистка белков из культуральной среды простого состава значительно проще, чем из клеточных лизатов, являющихся сложной смесью большого числа различных веществ. В связи с таким значением секреции этот процесс интенсивно изучается. Одним из непредвиденных результатов такого изучения стало обнаружение нескольких путей экспорта белков. Анализ родственных связей между белками, входящими в состав различных систем секреции у разных организмов позволил разбить эти системы на несколько групп, внутри которых механизм секреции идентичен или очень схож. Сейчас выделяют пять основных типов секреции, которые мы по очереди и разберем. Интересно, что компоненты секреции трех из пяти типов секреторных систем имеют значительное сходство с белками, участвующими в сборке жгутиков и ворсинок (пилей).

К сожалению, иногда в литературе по секреции не очень четко используются термины, в связи с чем не всегда понятно, о каком типе транспорта через мембраны идет речь. Поэтому здесь мы будем пользоваться следующими терминами для дифференциации основных секреторных путей по месту назначения транспортируемого белка:

- *секреция* – транспорт белка в окружающую среду. В случае грамотрицательных бактерий для этого белку необходимо преодолеть две мембраны – цитоплазматическую и внешнюю.

- *экспорт* - выведение белка за пределы цитоплазмы. Термин используется исключительно для грамотрицательных бактерий. Результатом экспорта является транспорт белка в периплазматическое пространство.
- *транслокация* – доставка белка патогенными бактериями в эукариотическую клетку хозяина. В случае грамотрицательных бактерий этот тип транспорта требует преодоления уже трех мембранных барьеров – двух бактериальных и одного эукариотического.

Важной проблемой секреции является направление секретируемого белка к месту его назначения. Секретируемые белки могут оказываться в различных местах:

- быть полностью встроенными в цитоплазматическую мембрану (интегральные мембранные белки, каковыми является большинство мембранных транспортеров);
- быть "заякоренными" в цитоплазматической мембране при помощи трансмембранного гидрофобного сегмента (практически всегда N-концевого), к этому классу принадлежит большинство периплазматических белков;
- полностью находиться в периплазме;
- быть полностью встроенными во внешнюю мембрану (порины);
- заякориваться во внешней мембране так, что основная масса белка располагается либо снаружи (чаще всего) либо в периплазматическом пространстве;
- во внешней среде (собственно секретируемые белки, к которым принадлежит большинство гидролитических ферментов патогенов);
- ассоциированными с мембраной эукариотической клетки (некоторые компоненты аппарата секреции III типа)
- внутри другой клетки, как правило эукариотической (большинство субстратов секреции III и IV типов)

И во всех этих случаях место конечной дислокации белка определяется его аминокислотной последовательностью – секреторные системы распознают определенные консервативные последовательности (мотивы) и направляют секретируемый белок в соответствии с записанной в этих мотивах информацией. Типичным примером того, как сложно бывает клетке определить назначение белка, является транспорт через внутреннюю мембрану интегральных мембранных белков и субстратов Sec-системы (части аппарата секреции II типа).

Для обоих классов белков сигналом их локализации являются довольно протяженные участки гидрофобных аминокислот (порядка 20 АК остатков). Такие участки, принимая α -спиральную конформацию, способны легко встраиваться в липидный бислой (поскольку на наружной поверхности такой спирали располагаются исключительно гидрофобные боковые группировки, а длина спирали как раз соответствует толщине липидного бислоя). Судьба белка будет зависеть от того, с каким из секреторных шаперонов – белком SecB (о котором мы поговорим чуть позже) или рибонуклеопротеидным комплексом SRP – провзаимодействует секретируемый белок.

Бактериальная "частица, распознающая сигналы" (signal recognition particle, SRP) является упрощенным аналогом эукариотической частицы с таким же названием. В клетках млекопитающих все секретируемые белки направляются в эндоплазматический ретикулум при помощи одного механизма, основой которого и является SRP. Эукариотическая SRP – крупный рибонуклеопротеидный комплекс, состоящий из 6 полипептидов и молекулы РНК длиной 300 рибонуклеотидов. Сначала 54 kDa субъединица SPR (SRP54) узнает специфические гидрофобные сигналы сразу после того, как они выходят с транслирующей рибосомы. Такими сигналами являются либо N-концевые отрезаемые сигнальные последовательности либо первый трансмембранный сегмент. Как только SPR свяжется с сигналом локализации, комплекс рибосома-мРНК-полипептид мигрирует к эндоплазматическому ретикулуму, где взаимодействие между SPR и гетеродимером рецептора SPR (SR) катализирует высвобождение синтезирующегося полипептида из комплекса и его инсерцию в транслокационный канал.

У прокариот интегральные мембранные и прочие секретируемые белки движутся к внутренней мембране по различным путям. Интегральные мембранные белки направляются к внутренней мембране при помощи бактериального варианта SPR. У бактерий SRP состоит всего из двух компонентов: белка Ffh - гомолога SPR54 и более короткой (около 100 нуклеотидов) РНК (4.5S РНК), а SR (рецептор SPR)

состоит только из гомолога α -субъединицы эукариотического SR - белка FtsY. Несмотря на существенные структурные отличия, биохимические свойства бактериальной SRP сходны с эукариотическим аналогом. Как и у эукариот, SRP из *E. coli* котрансляционно распознает трансмембранные сегменты как секреторные маркеры. С другой стороны, многие секретируемые белки направляются к аппарату секреции молекулярными шаперонами, такими как DnaK или (чаще) SecB.

Первая стадия реакции требует присутствия специфичных для секреции шаперонов - SecB и рибонуклеотидного комплекса называемого signal recognition particle (SRP), который состоит из белка Ffh и 4.5S РНК.

SecB и SRP узнают каждый свою часть секретируемых белков. Функция SRP наиболее существенна при экспорте интегральных мембранных белков. Самые последние экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что для транспорта интегральных мембранных белков (не имеющих протяженных цитоплазматических или периплазматических петель) достаточно только SRP (вместе с ее рецептором SR), а ни один из Sec белков не нужен.

Выбор SRP или SecA/SecB пути происходит "на выходе" синтезирующейся белковой цепи из рибосомы. Бактериальная SRP селективно распознает белки внутренней мембраны по их протяженным трансмембранным сегментам. А сходное взаимодействие SRP с менее гидрофобными и более короткими сигнальными последовательностями секретируемых белков, возможно, предотвращается ассоциированным с рибосомами шапероном триггерным фактором, который сильно связывается с цитоплазматическими и секретируемыми белками, но не взаимодействует с белками внутренней мембраны. Секреторные шапероны успешно распознают более короткие и менее гидрофобные трансмембранные сегменты сигнальных пептидов и направляют содержащий их белок к секреторному аппарату.

Основная проблема, решаемая всеми секреторными системами – обеспечить прохождение через гидрофобную мембрану длинной полипептидной цепи, содержащей значительные гидрофильные участки, и к тому же в нативном состоянии свернутой в громоздкую структуру. Именно поэтому, несмотря на то, что транспорт идет по градиенту концентрации, все секреторные системы расходуют энергию АТФ – на решение конформационных проблем. В решении конформационных проблем также участвует особый класс белков – секреторные шапероны. От уже изветных вам шаперонов GroE/DnaK секреторные отличаются участием исключительно в процессе секреции, и их функцией является задержка фолдинга секретируемых белков. Большинство секретируемых белков являются глобулярными и в полностью свернутом виде они просто не в состоянии преодолеть мембрану. Секреторные шапероны, как правило, связываются с предназначенным для секреции белком сразу же после его схода с рибосомы и не дают ему принять окончательную конформацию. Секреторный шаперон фактически доставляет белок с рибосомы к секреторному аппарату. Кроме того, для "разворачивания" (денатурации) белка, которая понадобилась бы, не будь секреторных шаперонов, необходима энергия, и секреторные шапероны ее экономят. Наконец, в некоторых случаях секреторные шапероны определяют специфичность секреторного аппарата. Так, в случае системы секреции III типа многие ее субстраты опознаются не сами по себе, а по шаперону, с которым они связаны. Очевидно, что в таком случае шапероны должны обладать высокой специфичностью. И действительно, для секреторных шаперонов аппарата секреции III типа субстратом является один, реже два белка. И в случае других секреторных шаперонов им в целом характерна большая избирательность по отношению к субстрату по сравнению с шаперонами HSP60/HSP70.

Интересно заметить, что эукариоты не имеют секреторных шаперонов по той простой причине, что секреция белка у них сопряжена с трансляцией – синтезируемая белковая цепь сразу, не успев принять свою нативную конформацию, попадает в секреторный канал. Прокариоты не могут воспользоваться таким механизмом, поскольку у них рибосомы присутствуют в огромном избытке по отношению к мембранным транслоказам (у эукариот такого избытка нет из-за гораздо большей поверхности эндоплазматического ретикулаума) и сопряжение секреции с трансляцией привело бы к существенному снижению скорости синтеза белка.

Секреторный аппарат первого типа.

Белки, секретируемые по первому пути, не имеют сигнальных пептидов и не используют т.н. общий секреторный путь (GSP), зависящий от *sec* генов. Эти белки в процессе секреции полностью

минуют периплазму и секретируются непосредственно во внешнюю среду. Секреторный аппарат первого типа устроен относительно просто. Во всех случаях он состоит из трех белков. Первый принадлежит к классу АТФаз, называемых ABC транспортерами и обеспечивает энергозависимые стадии процесса транспорта. Этот белок является цитоплазматическим и ассоциированным с димерным белком, обеспечивающим слияние цитоплазматической и наружной мембраны и фактически образующим канал, через который и транспортируется секретируемый белок. И третий белок-швейцар (gatekeeper) локализован во внешней мембране. Его функция - запирать мембранный канал, когда субстрат отсутствует.

Как правило, гены, кодирующие все три компонента секреторного аппарата, организованы в оперон, обычно вместе с геном (генами), кодирующим секретируемый белок. Секреторный

Специфичность

Несколько систем в одной бактерии.

Субстраты

Сигнал для секреции через аппарат 1-го типа располагается в их С-конце, обычно в пределах последних 60 АК. Секреторный аппарат опознает характерную последовательность вторичной структуры - две альфа-спирали, соединенные между собой гибким линкером.

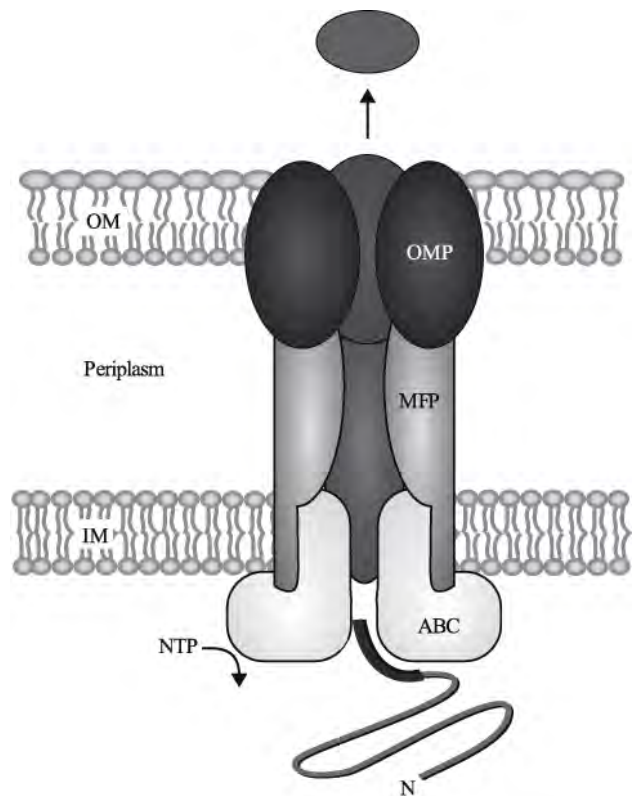


Рис.13.1. Секреторный аппарат I типа

Секреторный аппарат второго типа (GSP).

Из всех систем секреции только эта, а точнее, ее часть, ответственная за экспорт белков в периплазму - Sec система, - является необходимой для жизнеспособности клетки; гомологичные экспортные системы были найдены у архей и эукариот. Через секреторный аппарат II типа транспортируются разнообразные белки, такие как пектаттиазы, полигалактуроназы, пектинметилэстеразы и целлюлазы у эрвиний (по несколько изоферментов каждого класса); полигалактуроназа, целлюлаза, протеаза и амилаза у *Xanthomonas campestris*; липаза, фосфолипаза, эластаза, энтеротоксин А и щелочная фосфатаза у *Pseudomonas aeruginosa*; пуллуланаза у *Klebsiella oxytoca*. Именно в связи с большим числом и разнообразием субстратов, секретируемых через аппарат II типа его зачастую называют "общим секреторным путем" (General Secretory Pathway, GSP).

Характерной чертой аппарата второго типа является секреция белков в две стадии. Сначала они экспортируются через цитоплазматическую мембрану, где в случае Грам-положительных бактерий их секреция и заканчивается. В случае Грам-отрицательных бактерий белки оказываются в периплазме, и либо остаются там (и тогда говорят не о секреции, а об экспорте), либо встраиваются во внешнюю мембрану, либо секретируются во внешнюю среду посредством одной из терминальных ветвей GSP.

Sec система.

В отличие от секреции у эукариот, секреция через бактериальную плазматическую мембрану протекает в основном посттрансляционно. Работу Sec системы можно разделить на три стадии:

- направление белка на транспорт
- собственно транслокация белка через мембрану
- освобождение транспортированного белка на периплазматической стороне мембраны

На первой стадии пребелки направляются к точкам секреции в цитоплазматической мембране (местам, где собран транслокационный комплекс). На второй стадии полипептидная цепочка пересекает липидный бислой, скорее всего через транслоказу. На третьей стадии транслоцированный полипептид

освобождается и либо принимает свою нативную конформацию, либо направляется для дальнейшей секреции в одну из терминальных ветвей GSP.

Как минимум 10 белков необходимы для работы Sec системы (Рис. 13.2). Первая стадия реакции требует присутствия специфического для секреции шаперона SecB. Это шаперон является тетрамером, опознает белки, содержащие сигнальный пептид, и связывается с ними, выполняя фактически функцию молекулярного шаперона, связываясь с

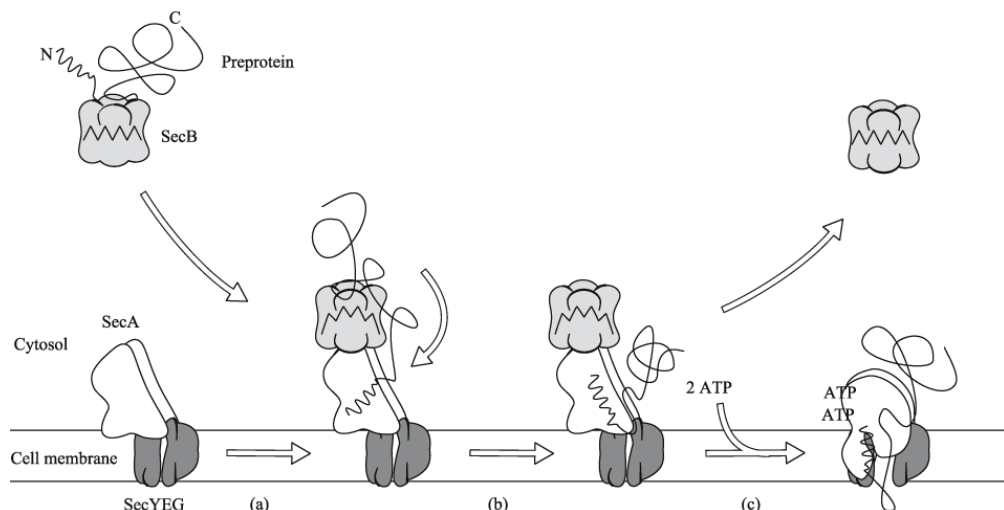


Рис.13.2. Sec-система

областями пресекреторных белков, не принявшими свою окончательную конформацию и поддерживая их в компетентном для транслокации состоянии. Второй функцией SecB является "доставка" предшественников белков к SecA субъединице мембранной транслоказы. В некоторых случаях могут привлекаться гомеостатические шапероны GroEL и DnaK.

Вторая стадия реакции катализируется сложным белковым комплексом, расположенным в цитоплазматической мембране - транслоказой. Транслоказа содержит пронизывающий мембрану канал, состоящий из субъединиц трех белков, SecY, SecE и SecG. Эти три белка являются интегральными мембранными белками, составляющими структурную основу транслоказы - каркас или раму. SecY - интегральный мембранный белок (10 НТМ - стр-ра подобная мембр транспортерам, напр, LacY). SecE имеет три трансмембранных сегмента, SecD и SecF - шесть. А «мотором» транслокационной машины служит АТФаза SecA. Этот белок уникален для бактерий - эукариоты используют другую транслокационную АТФазу. SecA - большая вытянутая димерная молекула, содержащая два домена - аминоконцевой АТФазный и карбокси-конец, необходимый для димеризации. Карбокси-концевой домен позволяет SecA связаться с SecYEG, что создает функциональную основу транслоказы. Дополнительные субъединицы транслоказы SecD и SecF оптимизируют секреторную реакцию. Источником энергии для секреции служит АТФ и протондвижущая сила (ускоряет транслокацию).

Сигналом для секреции служит т.н. лидерная или сигнальная последовательность, отщепляемая после транслокации специфической сигнальной пептидазой. Есть несколько сигнальных пептидаз, каждая из которых отщепляет сигнальные пептиды специфического класса секретируемых белков:

Сигнальная последовательность:

++hhhhhhhhhhhhhhhhhh (PG)NNANAP Oor- (LepB - основная)

++hhhhhhhhhhhhhhhhLNACD Oor- (LspA - для липопептидов)

++QGRGFhhhhhhhhhhhhNNNNN (GspO)

Сигнальная последовательность липопротеинов обязательно содержит цистеин, который модифицируется до глицерилцистеина перед отрезанием сигн. пептида, и именно здесь затем присоединяются жирные кислоты.

Сигнальные пептиды отрезаются лидерной пептидазой в момент транспорта белка через цитоплазматическую мембрану.

SecB направляет связанный белковый предшественник к мембранной транслоказе, связываясь с SecA, ассоциированным с SecYEG. Кроме того, после такого связывания сигнальный пептид связывается с карбокси-концевым доменом SecA, что еще более усиливает взаимодействие SecA-SecB. Это взаимодействие вызывает высвобождение зрелой части белкового предшественника из комплекса с SecB. Пре-белок таким образом переносится от SecB к SecA.

SecA (мутанты нежизнеспособны). Димер. АТФаза. Гидрофильный белок, но часто обнаруживается в ассоциации с мембраной и рибосомами. В определенных условиях *in vitro* присутствия только белка SecA может быть достаточно для транслокации белков через мембрану. Присутствует в клетке в большом избытке по сравнению с другими Sec-белками. Связывается сильно с SecY.

Периплазма

После экспорта в периплазму Sec-системой некоторые белки могут здесь и задержаться (причем большинство периплазматических белков олажается заякоренным в цитоплазматической мембране). Часть белков, однако, следует дальше и секретируется во внешнюю среду, причем такая секреция может осуществляться как минимум тремя различными способами.

Выход белка в периплазму в чем-то похож на его выход с рибосомы. Белок проходит через Sec-аппарат практически в полностью развернутом состоянии, поэтому перед ним вновь возникает проблема фолдинга. И, хоть большинство секретируемых белков способны сами справиться с этой проблемой, в периплазме, так же как и в цитоплазме, присутствуют шапероны. Кроме классических шаперонов фолдингу способствуют еще и белки DsbA и DsbC, являющимися дисульфидизомеразы. Функцией этих белков является образование дисульфидных мостиков между цистеиновыми остатками. Дисульфидные связи присутствуют у многих секретируемых белков. Такие связи обычно стабилизируют третичную структуру белка и совершенно необходимы для его функционирования. Дисульфидные мостики не могут образоваться в восстановительной среде цитоплазмы (к тому же появление таких связей препятствовало бы секреции), поэтому они образуются в периплазме, чему и способствуют ферменты DsbA и DsbC. Если зрелый белок должен содержать дисульфидные связи, без их образования под действием DsbAC секреция за пределы периплазмы, как правило, невозможна.

Основная терминальная ветвь GSP

JMB659 –GspEL interaction, good intro

Секреция во внешнюю среду белков, имеющих периплазматические интермедиаты, может происходить несколькими путями, называемыми "терминальными ветвями общего секреторного пути". Мы разберем работу только одного пути, который считают основным (Рис.13.3).

Основная терминальная ветвь GSP лучше всего изучена у клебсиелл и эрвиний. У обеих бактерий (впрочем, как и у всех остальных, изученных в этом отношении) все гены, кодирующие компоненты терминальной ветви, собраны в один кластер размером 13-15 т.п.н., в котором локализовано 12-15 генов. По историческим причинам эти гены называются по-разному – *pul* у клебсиелл, *out* у эрвиний, но мы будем пользоваться аббревиатурой *gsp*, принятой у некоторых бактерий и наилучшим образом отражающей функцию этих генов.

Мутанты по *gsp* генам накапливают в норме секретируемые продукты в периплазме, что свидетельствует в пользу того, что первая стадия (экспорт) проходит у таких мутантов нормально, и аппарат *gsp* нужен только для транспорта через внешнюю мембрану. Поэтому логично было бы предположить, что белки Gsp будут локализованы во внешней мембране или в периплазме. К удивлению исследователей, большая часть этих белков опрониживает цитоплазматическую мембрану, а один (GspE) вообще локализуется в цитоплазме. В большинстве случаев (GspGHJKLMN) белки имеют битопную конформацию с цитоплазматически локализованным N-концом и периплазматическим C-концом, причем

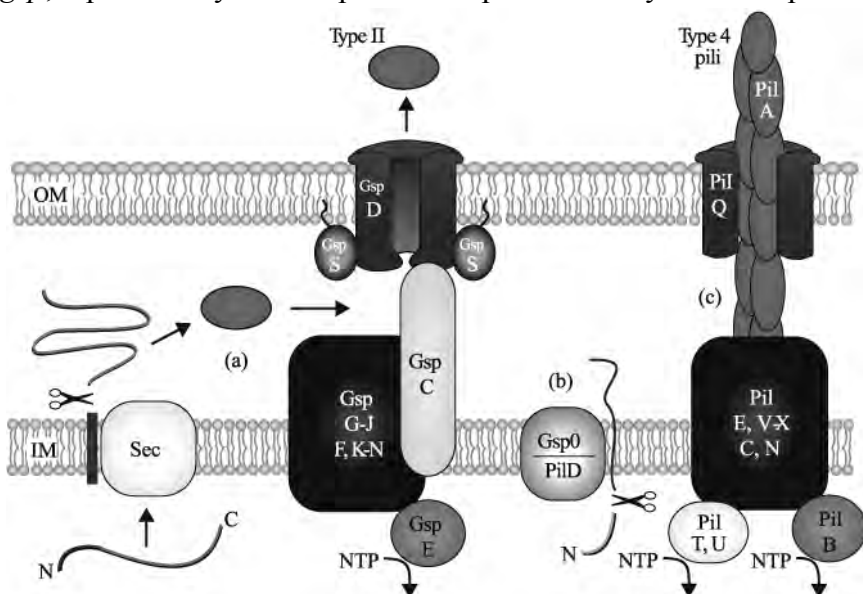


Рис.13.3. Основная терминальная ветвь общего секреторного пути

большая часть белка локализуется все-таки в периплазме. GspL имеет такую же топологию, но с большей частью, расположенной в цитоплазме. GspO и GspF являются политопными мембранными белками с несколькими пронизывающими мембрану доменами.

Функции четко известны не для всех Gsp белков. **GspO** – специфическая пептидаза для N-концевых секреторных сигналов белков **GspGHIJ(K?)**. Мишень, на которую действует пептидаза у каждого из этих четырех белков, такая же, как и у предшественников мономеров пилина, из которых складываются пили IV типа у некоторых бактерий (например, *P. aeruginosa*). Препилины процессируются пептидазой PilD, оставляющей метилированный остаток Phe на N-конце процессируемого белка. Поскольку белки GspGHIJ имеют типичный сайт разрезания N-MePe-пептидазой и процессируются при помощи GspO, их называют "псевдопилинами", хотя они и не участвуют в образовании пилей. К тому же, в отличие от пилинов, после процессинга псевдопилины не освобождаются, а остаются заякоренными в цитоплазматической мембране своими N-концевыми гидрофобными участками. Поэтому функция процессинга остается не совсем ясной, хотя и очевидно, что процессинг псевдопилинов необходим для нормальной сборки секреторного аппарата, поскольку мутанты по GspO к секреции не способны.

Белок **GspE** является цитоплазматическим и, тем не менее, совершенно необходим для секреции. Этот белок является типичным представителем ABC-транспортёров, и скорее всего является транспортной АТФазой, обеспечивающей энергией какие-то стадии секреторного процесса (скорее всего, сборку псевдопилюса), что осуществляется через белок GspL (показано его взаимодействие с GspE).

Только два компонента секреторного аппарата, **GspD** и **GspS** локализованы во внешней мембране. **GspD** принадлежит к крупному классу секретин, представители которого обязательно присутствуют во всех аппаратах секреции не только II, но и III типа. Гомомультимеры этого белка образуют цилиндрическую пору во внешней мембране, через которую и выходит из клетки секретиремый продукт. Белок имеет два четко выраженных домена. С-концевой необходим для мультимеризации белка во внешней мембране. N-концевой домен является периплазматическим и, скорее всего, именно он отвечает за видоспецифичность аппарата секреции.

Липопротейн **GspS** является специфическим шапероном для GspD, защищая его от протеолиза и способствуя inserции GspD во внешнюю мембрану.

На сегодняшний день нет устоявшегося мнения о том, как работает аппарат GSP. Скорее всего, многочисленные компоненты GSP взаимодействуют друг с другом, образуя трансмембранную структуру, простирающуюся от цитоплазматической стороны внутренней мембраны, через периплазму вплоть до внешней мембраны. Показано, что экспрессия GspE должна предварять синтез остальных белков аппарата терминальной ветви GSP. Возможно, что гидролиз АТФ вызывает у N-концевого домена GspL, ассоциированного с GspE, конформационное изменение, которое передается через мембрану периплазматическому домену GspL, что и вызывает сборку периплазматических компонентов терминальной ветви GSP.

Система секреции II типа высоко специфична. Несмотря на то, что белки-компоненты секреторного аппарата очень сходны друг с другом, их субстраты не будут секретироваться даже очень близкородственными бактериями. Так, например, пектацелиазы *E. carotovora* не будут секретироваться из близкородственного вида *E. chrysanthemi*, несмотря на то, что сходство белков секреторного аппарата превышает 90%. Это свидетельствует о том, что аппарат секреции содержит какой-то видоспецифический компонент. Наблюдается своеобразный парадокс: с одной стороны, каждая бактерия способна секретировать совершенно структурно несходные белки – пектацелиазы, целлюлазы, полигалактуроназы и т.д., а с другой – неспособна секретировать практически идентичную пектацелиазы из близкородственного вида.

Регуляция GSP

Как всегда в случае громоздкой белковой системы, клетка заинтересована в том, чтобы энергоёмкий синтез большого количества белков происходил только тогда, когда он необходим. Поэтому большинство оперонов, входящих в GSP-кластеры у различных бактерий, четко регулируется, хотя и по-разному у различных видов. Так, *pul* гены *Klebsiella* контролируются активатором MalT, а *out* гены эрвиний – репрессором KdgR. В обоих случаях экспрессия белкового аппарата, необходимого для секреции факторов вирулентности, произойдет при контакте с хозяином и появлении соответствующего индуктора – мальтозы или продуктов метаболизма клеточных стенок растений. Кроме того, экспрессия

Сходные опероны ряда организмов
Фенотип мутантов
Реконструкция Out пути в *E. coli*

1.1. Специфика аппарата секреции III типа и его компоненты.

Отличительными чертами этих систем секреции являются доставка факторов вирулентности непосредственно в клетку эукариотического хозяина (хотя часть белков, секретируемых по этому пути, остается связанной с поверхностными структурами бактерии или попадает в среду), а также использование большого количества специфических секреторных шаперонов.

Секреторный аппарат III типа *Yersinia* spp. состоит из как минимум 24 Ysc белков, 11 из которых консервативны у всех секреторных систем этого типа (включая таковые патогенов растений). Некоторым



сходством с аппаратом секреции III типа обладает система сборки бактериального жгутика – из 11 консервативных секреторных генов здесь присутствует 10. Не хватает только *uscC*, кодирующего белок внешней мембраны (секретин), через который Yop белки и попадают во внешнюю среду. Этот секретин является единственным белком системы секреции III типа, имеющим сходство с другими секреторными белками, а именно с секретинном GspD из аппарата секреции II типа. Предполагается, что 11 консервативных компонентов (Hrc-белков) формируют белок-проводящий канал, который пронизывает обе клеточные мембраны грамотрицательных бактерий. Такая структура была изолирована и охарактеризована для системы сборки бактериального жгутика (называемой также базальным телом). Секреторный аппарат базального тела транспортирует субъединицы крюка и флагеллин, которые после секреции полимеризуются и образуют длинный филамент, обеспечивающий подвижность бактерий. Секреторный аппарат III типа *S. typhimurium*, называемый игольчатым комплексом, напоминает по своей структуре базальное тело жгутика (имеет характерные кольца в различных слоях бактериальной клеточной стенки), но в его состав еще дополнительно входит секретин внешней мембраны. В дополнение к интегральным мембранным белкам в состав аппарата секреции III типа входит и несколько цитоплазматических компонентов, которые могут участвовать в доставке субстратов к сайту секреции. Некоторые компоненты секреторного аппарата, очевидно, являются мобильными, поскольку могут быть обнаружены как в цитоплазме бактериальной клетки, так и за ее пределами.

При повышении температуры до 37°C в отсутствие кальция иерсинии секретируют полтора десятка белков во внешнюю среду. Система секреции III типа не зависит от *sec*-белков. Соответственно, секретируемые белки не имеют сигнального пептида, характерного для системы секреции II типа. Тем не менее, сигнал для секреции закодирован в N-концевой части субстратов, с которыми происходит взаимодействие специфических секреторных шаперонов (а в некоторых случаях, возможно, сигналом является непосредственно мРНК). Распознавание субстрата является чрезвычайно специфичным и точным, поскольку в момент секреции бактерия способна специфически доставить конкретный субстрат в одно из трех возможных “мест назначения” – бактериальную оболочку, внешнюю среду или в цитозоль клетки эукариотического хозяина.

О структуре аппарата секреции у фитопатогенов известно очень мало, однако для нескольких бактерий показано наличие особенной поверхностной структуры, связанной с аппаратом секреции III типа. Эта структура, длинный тонкий филамент - *hrp*-пилюс, состоит, скорее всего, из одного белка HrpA и необходима для секреции. Секретируемые белки могут проходить через внутренний канал *hrp*-пилюса, хотя он и имеет небольшой диаметр 8-10 нм. Необходимыми компонентами аппарата секреции у фитопатогенов являются секретин HrcC (гомолог YscC иерсиний), ассоциированный с наружной мембраной липопrotein HrcJ, пять белков внутренней мембраны HrcR, HrcS, HrcT, HrcU, HrcV (HrpO), и два цитоплазматических белка HrcQ и HrcN, последний из которых является АТФазой.

1.2. Субстраты аппарата секреции III типа.

Наиболее хорошо изучены белки, секретируемые посредством аппарата III типа, опять же, у патогенов человека, прежде всего, у иерсиний. Наиболее интересные из этих белков и их функции перечислены ниже.

YopN - сенсор контакта, "затыкающий" секреторный канал. Похожей функцией обладает LcrG, но этот белок располагается в цитоплазме. Гомологом YopN у фитопатогенов является HrpJ, однако степень гомологии невысока, а роль этого белка при секреции у фитопатогенов не показана.

YopE – цитотоксин. Транслоцируется непосредственно в цитозоль макрофагов, где вызывает коллапс цитоскелета путем разрушения актиновых филаментов.

YopH - тирозин фосфатаза (попадая в цитозоль макрофага, дефосфорилирует компоненты сигнальной цепочки, необходимые в фосфорилированной форме для фагоцитоза)

YopB и YopD - мембранные транслоказы. Предполагается, что, будучи секретируемыми за пределы бактериальной клетки, эти белки ассоциируют с мембраной макрофага, образуя канал, через который и происходит транслокация остальных белков внутрь эукариотической клетки.

К числу белков, секретируемых посредством аппарата III типа фитопатогенов, относятся прежде всего непосредственные индукторы HR - Avr белки и харпины. По крайней мере несколько генов, кодирующих эти белки, входит в состав *hrp* кластеров. При всем отличии этих белков от секретируемых субстратов аппарата III типа у животных можно заметить удивительное сходство функций. Так, по крайней мере часть Avr-белков вызывает нарушение сигнальных каскадов в клетке хозяина,

контролирующих его защитный ответ (как и фосфатазы, доставляемые в цитозоль макрофагов иерсиниями) либо нарушение регуляции защитного ответа на уровне транскрипции, а харпины, скорее всего, ассоциируют с растительной клеточной стенкой и либо сами формируют транслокационный канал, либо способствуют его формированию (что напоминает работу белков YopB и YopD иерсиний).

Харпины – внеклеточные элиситоры реакции гиперчувствительности (быстрой гибели клеток растения в непосредственной близости от сайта внедрения "несовместимого" патогена). Это относительно небольшие (40-45 kDa) термостабильные белки с высоким (порядка 20%) содержанием глицина, низким тирозина и совсем лишенные цистеина. Харпины из различных фитопатогенов по гомологии аминокислотных последовательностей можно разделить на три группы – HrpN, HrpZ и HrpW. При всем сходстве общего аминокислотного состава первичные аминокислотные последовательности представителей разных групп не имеют заметного сходства, а внутри каждой группы это сходство невелико. Поскольку по гомологии аминокислотных последовательностей отнести белок к классу харпинов бывает сложно, единственным критерием является способность вызывать реакцию гиперчувствительности при инокуляции препарата относительно очищенного белка в ткани (как правило, листа) подходящего растения. Однако, несмотря на то, что харпины могут вызвать реакцию гиперчувствительности у растений, их роль в процессе патогенеза неоднозначна, поскольку у большинства проверенных штаммов инактивация харпинов не вызывает заметных фенотипических эффектов. О молекулярной роли харпинов пока известно мало, однако харпин HrpW имеет домен, сходный с пектатлиазами (но не обладающий, тем не менее, пектолитической активностью), что наводит на мысль о возможном взаимодействии этого белка с клеточной стенкой растений. И действительно, такое взаимодействие недавно было продемонстрировано, правда, для другого харпина – HrpZ. Было показано, что HrpZ, скорее всего, образует пору в мембране растительной клетки, что приводит к быстрой потере электролитов и гибели.

В отличие от харпинов, секретируемых аппаратом III типа в среду и уже после секреции взаимодействующих с поверхностными структурами растительных клеток, Avr-белки в норме во внешнюю среду не попадают, а доставляются непосредственно в растительные клетки. Хотя до сих пор транспорт Avr-белков в растительные клетки не продемонстрирован непосредственно, тому имеются многочисленные косвенные подтверждения. Прежде всего, часть Avr-белков имеет в своем составе аминокислотные последовательности, имеющие смысл только в эукариотической клетке, такие как сигнал ядерной локализации. Взаимодействие Avr-белков с их партнерскими R-генами растений было продемонстрировано в дрожжевой двухгибридной системе для нескольких Avr-R пар.

1.3. Организация и регуляция генов, кодирующих белки аппарата секреции III типа

Несмотря на значительные таксономические различия между бактериями, обладающими системами секреции III типа, различия в образе жизни этих патогенов и принадлежность их хозяев к разным царствам (растений и животных), между всеми системами секреции III типа имеется много общего. Наиболее интересным является то, что все известные системы III типа, как у фитопатогенов, так и у патогенов животных, организованы в крупные кластеры генов, состоящие из нескольких оперонов, полностью кодирующих все компоненты соответствующих секреторных аппаратов. Как правило, в состав этих кластеров входят также и гены, кодирующие секретируемые субстраты. Следует заметить, что во многих случаях эти кластеры ограничены по краям мобильными генетическими элементами и имеют нуклеотидный состав (%GC), существенно отличающийся от остальной части генома бактерии. Такая организация кластеров секреторных генов может свидетельствовать о сравнительно недавнем приобретении их соответствующей бактерией и о том, что такие "острова патогенности" могут относительно свободно перемещаться горизонтально между таксономически весьма удаленными бактериями.

У всех изученных фитопатогенных бактерий большинство *hrp* генов располагается в одном большом кластере размером 20-25 т.н.п. и организовано в 7-8 транскрипционных единиц. Четыре наиболее полно охарактеризованных на сегодняшний день кластера могут быть разделены на две группы на основании сходства между составляющими их генами, структурой оперонов и регуляторными системами. К первой группе можно отнести *hrp* кластеры *P. syringae* и *E. amylovora*, а ко второй – *R. solanacearum* и *X. campestris*.

Интересным является то, что и регулируются гены этих двух групп кластеров по-разному. Основным регулятором у *P. syringae* и *E. amylovora* является альтернативный сигма-фактор, а у *R. solanacearum* и *X. campestris* семейства (как, кстати, и у иерсиний) – активатор AraC (Рис. 13.5)

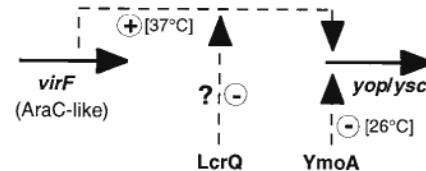
Наиболее хорошо система регуляции изучена у *P. syringae* pv. *syringae*. Для этой бактерии было показано, что HrpR, HrpS, и HrpL являются частью многокомпонентной регуляторной системы, контролирующей экспрессию *hrp* и *avr* генов. HrpR и HrpS принадлежат к классу NtrC-подобных σ^{54} -зависимых энхансеров транскрипции. HrpR и HrpS отличаются от большинства членов семейства NtrC тем, что они утратили аминоконцевой регуляторный домен, который изменяет регуляторную активность (в связи с чем можно предположить, что в сигнальной цепи, ведущей к активации *hrp*-генов, обязательно должны присутствовать другие белки), однако они по-прежнему содержат консервативный карбоксиконцевой ДНК-связывающий домен. Действие NtrC-подобных энхансеров транскрипции осуществляется через взаимодействие с альтернативным σ -фактором RpoN (σ^{54}), и было показано, что *rpoN* ген необходим для экспрессии *hrp* генов у нескольких патоваров *P. syringae*. RpoN осуществляет свое действие через контроль экспрессии другого сигма-фактора, HrpL, принадлежащего к ECF семейству (extra cytoplasmic functions) сигма-факторов. А уже HrpL активирует транскрипцию с зависящих от него промоторов, каковыми являются практически все изученные на сегодняшний день промоторы оперонов, кодирующих *hrp* и *avr* гены. Показано связывание HrpL с консервативной промоторной последовательностью GGAACCNA-N₁₄-CCACNNA, называемой *hrp*-боксом. Аналогичная схема регуляции имеет место и у *E. amylovora*.

Секреторные шапероны.

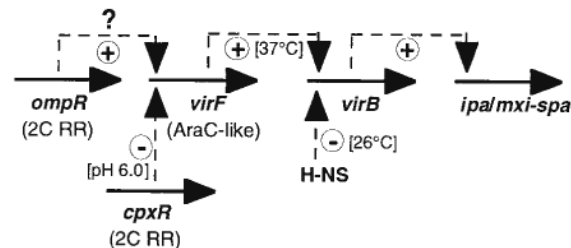
Для секреции многих субстратов через аппарат 3-го типа необходимо действие специфических цитоплазматических шаперонов. Первыми обнаруженными и наиболее изученными являются Sys шапероны *Yersinia*, необходимые для секреции Yop белков. Характерной чертой этих шаперонов является специфичность – все Sys белки взаимодействуют только с одним секретируемым белком (только в одном случае с двумя). Утрата одного шаперона блокирует секрецию соответствующего белка, тогда как секреция остальных субстратов данного секреторного аппарата не нарушается. Белок, лишенный шаперона, накапливается в цитоплазме и зачастую быстро деградирует.

В то время как взаимодействие между собой и вообще судьба факторов вирулентности после секреции изучена слабо, много информации имеется о взаимодействии между собой жгутиковых белков (использующих фактически такую же систему секреции) после их экспорта из клетки. Эти белки, как правило, полимеризуются с образованием характерных жгутиковых структур. Базальное тело жгутика,

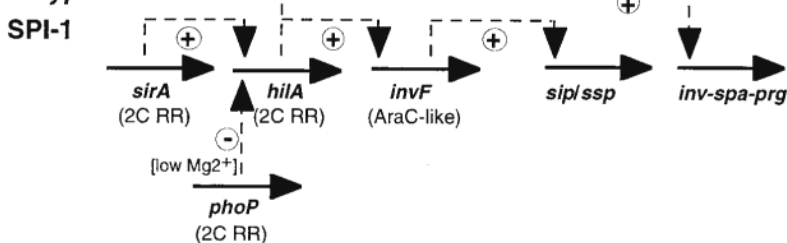
Yersinia spp.



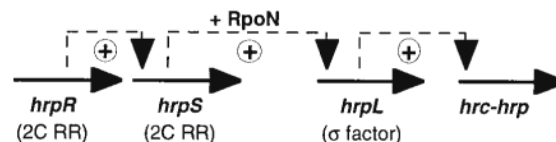
S. flexneri



S. typhimurium



P. syringae



X. campestris

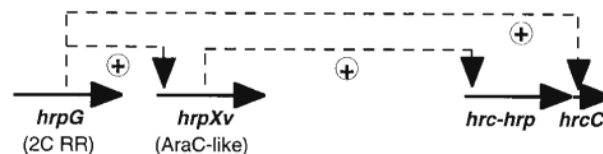


Рис.13.5. Транскрипционная регуляция систем секреции III типа

пронизывающее периплазматическое пространство, состоит из 5 белков (FlgB, C, F и G, FliE). К нему прикреплен достаточно гибкий крюк (FlgE), выходящий за пределы поверхности клетки. К крюку присоединена длинная нить жгутика, состоящая из одного белка (FliC), для прикрепления которого к крюку необходимы два белка, FlgK и FlgL, а конец нити жгутика защищен еще одним белком, FliD. Базальное тело жгутика представляет собой не что иное, как секреторный аппарат секреции пяти белков – субъединиц крюка, нити и FlgK, FlgL и FliD. А поскольку диаметр секреторного канала, через который должны проходить эти белки, невелика – всего 25-30Å, все эти белки (включая и некоторые субъединицы базального тела) должны транспортироваться в частично развернутом состоянии. Что проблематично, ибо эти белки преимущественно имеют α -спиральную структуру и имеют выраженную склонность к олигомеризации. Для предотвращения окончательного фолдинга и самосборки жгутиковых субъединиц в цитоплазме бактерия использует специфические шапероны, которых на сегодняшний день описано три – FlgN, FliT и FliC.

Таким образом, использование субстрат-специфических шаперонов в процессе секреции является характерным для обоих “подтипов” аппаратов III типа. Оба типа шаперонов обычно связываются с небольшим районом субстрата. Но имеются и существенные отличия. Для факторов вирулентности этот район располагается в пределе первых 125 аминокислот с N-конца и соответствует области, необходимой для транслокации субстрата в эукариотические клетки, тогда как шаперон-связывающий домен жгутиковых белков расположен в пределах последних 40 АК белка (самый карбокси-конец) и необходим для взаимодействия жгутиковых субъединиц между собой.

Что же представляет собой секреторный сигнал? Как у жгутиковых субъединиц, так и у продуктов генов вирулентности он расположен в N-конце белка. Но по крайней мере в случае Yop белков белковая природа сигнала находится под вопросом. Эксперименты со введением сдвига рамки в начальную часть уор генов показали, что секреция не нарушается, если этот сдвиг компенсируется еще одной мутацией через 15-17 кодонов. С другой стороны, по крайней мере для некоторых Yop белков показана абсолютная зависимость секреции от действия соответствующего шаперона.

Секреторный аппарат IV типа

Система секреции IV типа имеет выраженное сходство с аппаратом конъюгации ряда плазмид и скорее всего произошла от него. Эта экспортная система характеризуется чрезвычайно широкой специфичностью как по отношению к субстратам (крупные нуклеопротеидные комплексы, мультикомпонентные белковые токсины и мономерные белки), так и по отношению к мишеням секреции, каковыми могут служить бактерии, грибы, растения и животные (иными словами, клетки представителей всех царств за исключением архей).

Изначально система секреции IV типа была выделена при обнаружении сходства трех секреторных аппаратов - транспорта Т-ДНК *A. tumefaciens*, Tra системы IncN плазмиды pKM101 и системы секреции токсина *B. pertussis*. Затем сходство с этими секреторными аппаратами было обнаружено у еще нескольких Tra систем и системы секреции балка CagA – фактора вирулентности *Helicobacter pylori*.

Таким образом, многие системы IV типа переносят ДНК, но необходимо отметить, что переносится не ДНК сама по себе, но одонитевая ДНК, связанная с одним или несколькими белками. Эти белки участвуют в процессинге ДНК в точке начала переноса (oriT), ведущем к образованию конъюгационного интермедиата. Трансэстераза инициирует процессинг, связываясь с ДНК в точке oriT (либо функционально эквивалентных границах Т-ДНК у агробактерий) и внося одноцепочечный разрыв. После внесения разрыва трансэстераза остается ковалентно связанной с 5' концом одной нити через тирозиновый остаток. Одонитевая ДНК при конъюгации переносится как раз в направлении 5' -> 3', и скорее всего именно трансэстераза обеспечивает опознавание конъюгационного интермедиата секреторным аппаратом. В случае *A. tumefaciens* трансэстераза VirD2 экспортируется вместе с Т-ДНК в растительную клетку, где сигналы ядерной локализации, присутствующие в VirD2, направляют Т-ДНК в ядро клетки. Таким образом, конъюгационные системы можно рассматривать как аппарат секреции белка, приспособленный для экспорта ковалентно связанной с белком ДНК.

Кроме того, недавно было показано, что конъюгационные системы могут транспортировать и не связанные с ДНК белки. Так, Tra аппарат плазмиды RP4 способен секретировать белок ResA, а система

переноса Т-ДНК способна секретировать VirE2 (SSB белок) и еще один фактор вирулентности, VirF. Интересно, что для секреции VirE2 необходимо участие шаперона VirE1. VirE1 стабилизирует VirE2 *in vivo* и препятствует его агрегации *in vitro*, что делает его похожим на Syc шапероны *Yersinia*.

Белковые субстраты систем секреции IV типа патогенов животных радикально отличаются от субстратов Тра систем, тем не менее, имеется значительное сходство аппаратов секреции. Например, система Ptl *B. pertussis* секретирует сложный токсин РТ, принадлежащий к группе А/В токсинов и состоящий из 5 субъединиц, S1-S5. Домен А токсина состоит из субъединицы S1, а В домен – из S2-S5 субъединиц в соотношении 1:1:2:1. В отличие от Тра систем экспорт РТ – двухстадийный процесс. Субъединицы РТ сначала экспортируются через цитоплазматическую мембрану при помощи Sec системы, затем холотоксин собирается в периплазме и в собранном виде транспортируется через внешнюю мембрану системой Ptl. После экспорта В домен токсина взаимодействует с гликопротеиновыми рецепторами хозяйской клетки и обеспечивает транслокацию домена А внутрь. Внутри хозяйской клетки домен А нарушает сигнальные пути путем рибозилирования регуляторных белков.

Аппарат секреции IV типа (который мы рассмотрим на примере более изученных Тра систем) состоит из двух поверхностных структур, конъюгационного канала, через который происходит транслокация ДНК и белков, и конъюгационного пилуса, необходимого для контакта с реципиентной клеткой. Структура системы секреции изучена недостаточно, и пока выделяют несколько групп белков, функции которых до конца не выяснены:

поверхностные белки, участвующие в формировании пилуса и др. поверхностных структур;
компоненты конъюгационного канала;
АТФазы цитоплазматической мембраны.

Изучение систем секреции II-IV типов выявило некоторое сходство между ними. Так, системы III и IV типа начинают секрецию только при контакте с клеткой-мишенью. Обе системы используют специфические шапероны. Обе системы (как правило) транспортируют субстраты в одну стадию через трансмембранный канал, пронизывающий обе мембраны. Наконец, обе системы каким-то образом используют пили в секреторном процессе.

Имеется также сходство и с системой секреции II типа (особенно если рассматривать секрецию РТ *B. pertussis*). Интересно, что холерный токсин, очень схожий с РТ *B. pertussis*, транспортируется через систему II типа. Кроме того, бактериофаг СТХф *V. cholerae* выходит из клетки через аппарат II типа – таким образом, и система секреции II типа может обеспечивать транспорт ДНК в ассоциации с белками.

В дополнение к секреторным механизмам, требующим участия специального аппарата секреции недавно был описан случай "самотранспорта" белка, а именно протеазы IgA *Neisseria gonorrhoeae* через внешнюю мембрану

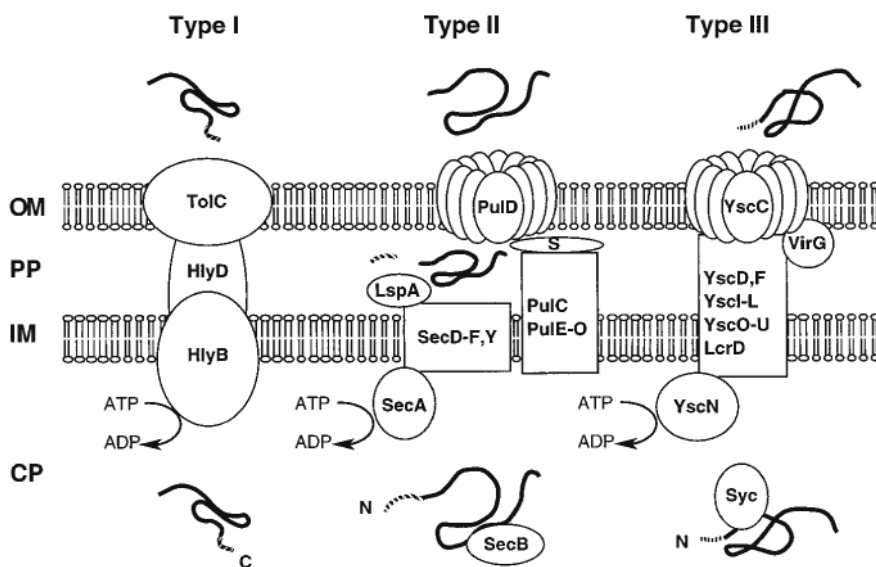


Рис.13.6. Сходство систем секреции I-III типов

Литература:

1. A. Economou. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. Trends in Microbiology 1999 VOL. 7 NO. 8 p. 315-320
2. D. M. Anderson and O. Schneewind. Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. Current Opinion in Microbiology 1999, 2:18-24

2. S. Lory. Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. *Current Opinion in Microbiology* 1998, 1:27–35
(Сравнительная характеристика 4 путей секреции)
 4. L. W. Cheng and O. Schneewind. Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends in Microbiology* 214-220 Vol. 8 No. 5 May 2000
 5. C. J. Hueck. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 1998, p. 379–433 Vol. 62, No. 2
-

14. Строгий ответ

Это реакция клеток на аминокислотное голодание, приводящая к значительному замедлению синтеза стабильных РНК (рРНК и тРНК) и некоторых мРНК, необходимых для синтеза рибосомных белков, факторов элонгации EF-Ts, EF-Tu и EF-G, α -субъединицы РНК-полимеразы, а также к усилению транскрипции оперонов биосинтеза аминокислот. Общий синтез РНК снижается в итоге до 5-10% от нормального. Возрастает скорость деградации белка, уменьшается синтез нуклеотидов, липидов и углеводов.

Строгая регуляция осуществляется несколькими генами, наиболее изученным из которых является ген *relA*. Этот ген отвечает за синтез двух специфических нуклеотидов, накапливающихся при аминокислотном голодании - гуанозинтетрафосфата (ppGpp) и гуанозинпентафосфата (pppGpp). Эти нуклеотиды и являются ингибиторами синтеза специфических типов РНК. Сигналом образования ppGpp служит не непосредственно отсутствие какой-либо аминокислоты, а недостаток аминоацил-тРНК. Белок RelA в ассоциации с рибосомами синтезирует (p)ppGpp только когда в А-сайте рибосомы оказывается ненагруженная аминикислотой тРНК.

Строгий ответ - фундаментальный механизм регуляции, свойственный практически всем бактериям, но интересно, что некоторые из них приспособили его в качестве сенсорной системы для регуляции других клеточных функций. Так, миксобактерии используют гуанозинтетрафосфат в качестве сигнала к образованию плодовых тел. Клетки миксобактерий не имеют жгутиков, однако способны передвигаться за счет скольжения по различным поверхностям, включая поверхность других клеток. Используя такую способность, миксобактерии строят свои плодовые тела, начиная с однородного тонкого слоя клеток. Весь процесс занимает несколько часов. сначала появляется несколько локальных скоплений клеток, затем, как только в одном из них соберется около 10^5 клеток, начинается миграция всех остальных клеток популяции в это скопление, формирование плодового тела характерной для каждого вида формы и дифференциация палочковидных клеток в сферические споры.

Голодание по любой аминокислоте вызовет накопление (p)ppGpp, а поскольку синтез аминоацил-тРНК зависит от АТФ, недостаток энергии или фосфата будет иметь тот же эффект, что и аминокислотное голодание. У миксобактерий накопление (p)ppGpp имеет тот же эффект, что и у *E. coli*, но дополнительно еще запускает программу дифференциации, контроль которой осуществляется рядом секретлируемых пептидных факторов и соответствующих сенсоров вкупе с системами передачи сигнала. Строгий ответ индуцирует экспрессию генов, необходимых для перестройки внутриклеточного метаболизма в соответствии с голоданием, а также индуцирует синтез специфического феромона - А-фактора. А-фактор активирует экспрессию группы генов, необходимых для агрегации миксобактерий. Одним из этих генов является *csgA*, кодирующий синтез следующего межклеточного сигнала, С-фактора - поверхностного белка размером 17 кДа. С-фактор, в свою очередь, контролирует три процесса - агрегацию клеток, экспрессию целого ряда генов (включая сам *csgA*) и споруляцию. С-фактор, закрепленный на поверхности одной клетки, при контакте с другой индуцирует активацию двухкомпонентной сенсорной системы с регулятором транскрипции FruA. FruA имеет три мишени - *frz*, *devTRS* и *csgA*. Первая мишень кодирует белки, гомологичные Che белкам *E. coli* и отвечающие за направление скольжения миксобактерий, и результатом такой активации является агрегация клеток в плодовые тела. Продукты оперона *devTRS* необходимы непосредственно для споруляции.

15. SOS ответ

Бактерии очень часто подвергаются воздействию различных природных и антропогенных воздействий, которые нарушают целостность ДНК. Повреждения ДНК блокируют ее репликацию и поэтому представляют серьезную угрозу выживанию клетки. Для борьбы с такими повреждениями бактерии имеют целый ряд белков, репарирующих ДНК, нормализующих клеточное деление, повышающих толерантность к повреждениям, которые координированно экспрессируются после повреждения ДНК. Такая глобальная реакция получила название "SOS-ответ"

Основная регуляция SOS-ответа у *E. coli* осуществляется двумя белками – рекомбиназой RecA и транскрипционным репрессором LexA, которые и сами тоже являются SOS-индуцируемыми. Накопление повреждений в ДНК приводит к активации копротеазной активности белка RecA. В активированном состоянии RecA индуцирует автокаталитическое расщепление белка LexA. В результате резко падает концентрация функционально активного димера LexA. освобождаются операторы генов SOS-регулона и резко возрастает их транскрипция.

Повреждение ДНК не индуцирует SOS-ответ непосредственно. Предполагается, что одонитевая ДНК, которая накапливается в клетке при ингибировании репликации ДНК повреждениями, дает тот метаболический сигнал, который и активирует копротеазную активность RecA. В активированном состоянии RecA образует спиральные нуклеопротеиновые филаменты на одонитевой ДНК. LexA распознает эту структуру и связывается с глубокой спиральной бороздкой RecA-нуклеофиламента. Это связывание индуцирует быстрое автокаталитическое расщепление белка LexA в области шарнира, соединяющего два домена LexA – карбоксиконцевой димеризационный и аминоконцевой ДНК-связывающий. Таким образом, репрессор LexA расщепляется автокаталитически, так же как и белки UmuD, MucA и репрессор фага λ CI. А роль белка RecA заключается лишь в активации этой автокаталитической реакции (из-за чего RecA и называют копротеазой).

Гены SOS-регулона можно разделить на две группы. "Классические" негативно регулируются на транскрипционном уровне белком LexA и индуцируются в результате его автокаталитического протеолиза, стимулируемого активированным RecA. Эти гены имеют в своей промоторной области четко выраженный LexA сайт (консенсус 5'-taCTGTatatatACAGta-3').

Наиболее значимыми "классическими" членами SOS-регулона являются следующие гены (их сейчас известно около 30):

Гены	Продукты/функции
<i>lexA</i>	Индукция SOS-ответа
<i>recA</i>	Рекомбинационная репарация; индукция SOS-ответа
<i>ruvAB</i>	Рекомбинационная репарация
<i>recN</i>	Рекомбинационная репарация
<i>uvrA</i>	Эксцизионная репарация (белок, узнающий повреждения в ДНК)
<i>uvrB</i>	Эксцизионная репарация (эндонуклеаза)
<i>uvrD</i>	Эксцизионная репарация (хеликаза)
<i>umuDC</i>	Склонная к ошибкам репарация (SOS-мутагенез)
<i>sulA</i>	Ингибитор клеточного деления

Все больше и больше обнаруживается SOS-индуцируемых генов, которые не регулируются непосредственно LexA.

SOS-регулон интересен тем, что всего одна пара регуляторных белков обеспечивает несколько вариантов ответа на повреждение ДНК. Такое поведение частично можно объяснить различной аффинностью репрессора к операторным сайтам, расположенным в промоторных областях соответствующих генов. Чем слабее связывание репрессора с оператором, тем раньше произойдет индукция соответствующего гена при SOS-ответе. Так, UvrA белок, контролирующий эксцизионную репарацию, индуцируется практически немедленно после возникновения повреждений ДНК, и первые 20-30 минут SOS-ответа клетка репарирует повреждения путем вырезания поврежденных нуклеотидов и оснований. Через полчаса в клетке накапливается достаточно RecA (его количество увеличивается более, чем в 10 раз), RuvAB и RecN для активации рекомбинационной репарации, которая продолжается еще около 30 минут. Приблизительно через час после индукции "включается" склонная к ошибкам репарация (контролируемая генами *umuDC*), которая продолжается еще 30-40 минут. Такая

временная последовательность событий характерна для клеток *E. coli*, растущих относительно медленно на синтетической среде с временем удвоения 50 минут.

Наиболее важным следствием такой регуляции является то, что такая "ступенчатая" индукция членов SOS-регулона позволяет клеткам с минимальными повреждениями индуцировать системы безошибочной (но достаточно медленной) репарации (такой как эксцизионная и рекомбинационная), не включая другие, потенциально склонные к ошибкам (хотя и быстрые) репарационные пути. И действительно, индукция генов *umuDC*, необходимых для склонной к ошибкам репарации в обход крупных повреждений, требует гораздо более сильного повреждения ДНК. И, наконец, длительное присутствие в клетке нерепарируемых повреждений приводит к индукции SulA-зависимой филаментации и позволяет профагам "удрать" из гибнущей клетки путем индукции литического цикла.

SOS-мутагенез

Достаточно давно было замечено, что индукция SOS-ответа приводит к существенному увеличению частоты мутаций. Этот феномен оказался связан с вариантом репарации, который индуцируется при SOS-ответе в последнюю очередь. Идея UmuDC-зависимой репарации заключается в том, что, когда клетка не может (или не успевает) восстановить исходную последовательность ДНК, она пытается продолжить репликацию ДНК, вставляя случайные основания в синтезируемую цепь напротив повреждений. Это позволяет репликационной вилке продолжить работу (и таким образом восстановить жизнеспособность клетки). Это позволяет клетке решить немедленную проблему, однако создает потенциальные проблемы в дальнейшем из-за очень высокой вероятности возникновения мутаций.

Для индукции SOS-мутагенеза требуются ферменты реписомы, белок RecA и белки UmuD и UmuC, причем UmuD должен претерпеть автопротеолитическое расщепление (аналогично LexA) с образованием UmuD', две субъединицы которого образуют комплекс с UmuC (UmuD'₂UmuC), который вместе с другими компонентами реписомы и обеспечивает мутагенный синтез ДНК (поэтому комплекс UmuD'₂UmuC называют еще ДНК-полимеразой V). UmuD'₂UmuC связывается с концом RecA-нуклеофиламента, затем с ДНК-полимеразой, что позволяет клетке возобновить репликацию ДНК, а возобновление репликации приводит к разрушению нуклеофиламента (и, соответственно, ликвидации SOS-индуцирующего сигнала).

Литература:

1. W.H. Koch, R. Woodgate. DNA Repair in Prokaryotes and Lower Eukaryotes. DNA Damage and Repair. vol.1: Edited by: Nickoloff and MF Hoekstra
 2. G.C. Walker. The SOS Response of Escherichia coli. The Bible. 1996 p 1400-1416
-

17. Регуляция стабильности мРНК

Синтез определенного количества матричной РНК не обязательно гарантирует продукцию пропорционального количества белка. Сила экспрессии определенного гена зависит не только от эффективности его транскрипции, но в значительной мере от того, что происходит с транскриптом после его синтеза. Сразу после синтеза транскрипт приобретает определенную вторичную структуру, от чего в значительной степени будут зависеть его стабильность и скорость процессинга (у эукариот), а также эффективность трансляции. Дополнительные возможности регуляции имеются у эукариот в связи с наличием сложного процессинга первичных транскриптов. Наконец, эффективность экспрессии гена очень сильно зависит от стабильности его мРНК. Так, у прокариот время полужизни различных мРНК варьирует в пределах от 20 секунд до более чем 20 минут.

Стабильность мРНК обычно не зависит напрямую от ее размера, а определяется многими факторами, основными из которых являются ее вторичная структура, элементы первичной последовательности (сайты узнавания для специфических рибонуклеаз) и эффективность трансляции.

Наличие элементов вторичной структуры, как правило, стабилизирует РНК, поскольку препятствует работе многих РНКаз (Рис. 17.1). Большинство мРНК имеют на своем нетранслируемом 3' конце достаточно стабильные шпильчатые структуры. Это в первую очередь терминаторы, однако имеются и другие элементы вторичной структуры. Так, у *E. coli* имеется около 500 так называемых REP (repetitive extragenic palindromes) элементов – палиндромов, способных образовывать достаточно крупные шпильчатые структуры на 3' концах матричных РНК. В некоторых случаях шпильчатые структуры могут присутствовать и на 5' концах мРНК.

Немаловажным для стабильности мРНК является наличие хорошего рибосомсвязывающего сайта (на надлежащем расстоянии перед старт-кодоном). Рибосома, транслирующая мРНК, защищает 35-50 нуклеотидов от атаки рибонуклеаз, которые могут разрушить РНК. Если мРНК эффективно транслируется, она фактически полностью будет покрыта рибосомами, что

существенно уменьшит вероятность ее деградации рибонуклеазами.

Даже во время трансляции мРНК может выступать субстратом для рибонуклеаз. Уже один разрыв в молекуле мРНК с большой вероятностью ее инактивирует. Если в результате разрыва оказывается удален рибосомсвязывающий сайт, такая мРНК, естественно, не может транслироваться. Если же разрыв произойдет где-то посередине кодирующей последовательности, трансляция будет происходить, однако белок окажется укороченным и почти наверняка нефункциональным. Кроме того, клетка, скорее всего, повесит на такой укороченный белок ярлык, направляющий его на протеолиз (напр., при помощи *ssrA* РНК у *E. coli*). Кроме того, обычно, если деградация мРНК уже началась, процесс ее разрушения завершается очень быстро.

Деградация мРНК у *E. coli* осуществляется совместно эндо- и экзорибонуклеазами. Две экзонуклеазы, РНКаза II и полинуклеотидфосфорилаза (ПНФаза, PNPase), разрушают РНК в направлении 3'→5'. Похожие экзорибонуклеазы широко распространены как у про-, так и у эукариот. РНКаза II – гидролитический фермент, дающий при расщеплении РНК нуклеотидмонофосфаты. ПНФаза использует при гидролизе неорганический фосфат, генерируя нуклеотиддифосфаты. Инактивация обоих экзорибонуклеаз приводит к накоплению в клетке промежуточных продуктов деградации мРНК и является летальной.

3' концы многих мРНК (в первую очередь образовавшиеся в результате р-независимой терминации) образуют стабильные шпильчатые структуры, которые защищают РНК от деградации экзорибонуклеазами. Расщепление мРНК "в середине" при помощи эндорибонуклеазы может убрать шпильку, образуя незащищенный 3' конец, доступный для экзорибонуклеаз. Эндорибонуклеаза E (РНКаза E, RNase E), первоначально идентифицированная как необходимая для процессинга рибосомной 5S РНК, также определяет стабильность многих мРНК.

Эндонуклеазное расщепление РНК менее важно у эукариот, где основная деградация мРНК обеспечивается экзонуклеазами. У дрожжей описано два

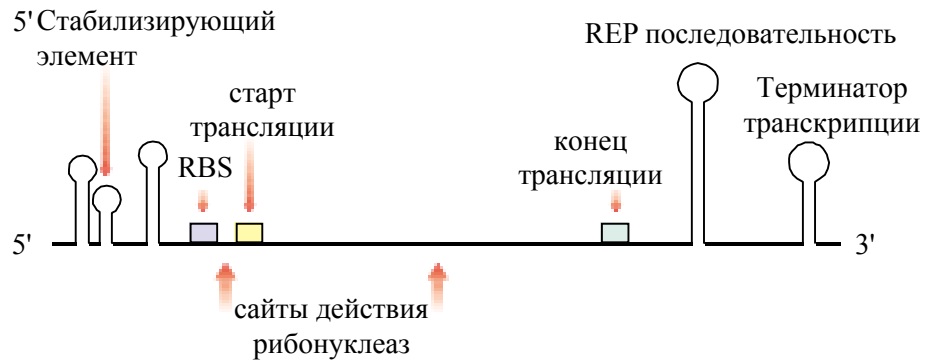


Рис.17.1. Факторы, влияющие на стабильность прокариотической мРНК

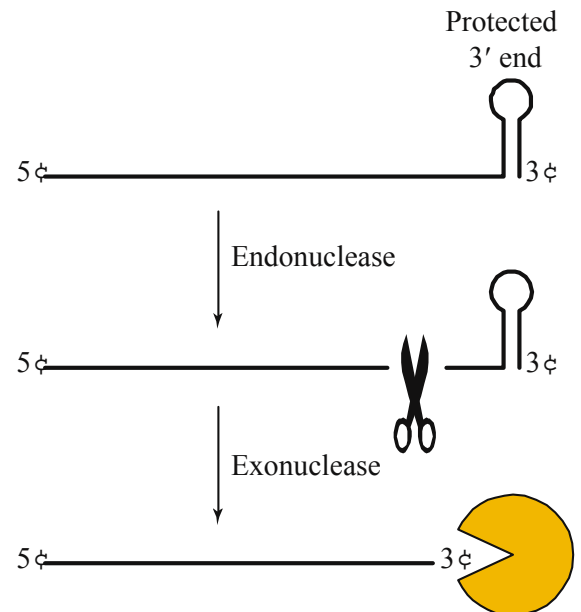


Рис.17.2. Деградация мРНК прокариот

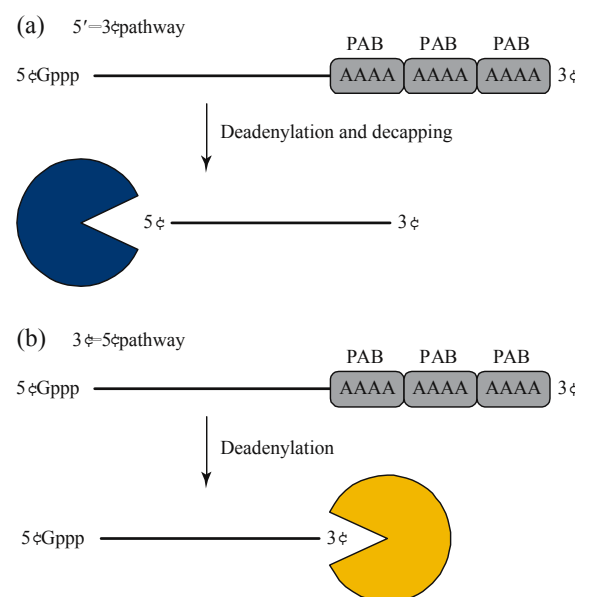


Рис.17.3. Деградация мРНК эукариот

экзонуклеолитических механизма, работающих в направлениях 5'→3' и 3'→5'. Эукариотические мРНК защищены от деградации кэпом на 5' конце и поли(А) хвостом в комплексе с поли(А)-связывающим белком (РАВ) на 3' конце, и декэпирование и деаденилирование являются необходимыми предпосылками для деградации. У дрожжей в 5'→3' пути деградации декэпирование зависит от деаденилирования, и а мРНК деградируется экзонуклеазой XRN1. 3'→5' путь деградации обеспечивается мультибелковым комплексом – экзосомой. Интересно, что *E. coli* не имеет 5'→3' экзонуклеазного пути. 5' конец мРНК у прокариот не кэпирован, а 5'→3' экзорибонуклеазы не известны, однако структура, подобная кэпу, все же имеется. На 5' конце эубактериальных мРНК, как правило, находится трифосфат, и его присутствие ингибирует действие эндорибонуклеаз. После первого расщепления мРНК эндорибонуклеазой на вновь образованном 5' конце РНК остается монофосфат, уже неспособный блокировать дальнейшее эндонуклеолитическое расщепление. Именно поэтому первая атака эндорибонуклеазой является лимитирующей по времени, а дальнейшее расщепление мРНК при помощи эндонуклеаз и 3'→5' экзонуклеаз (для последних первое расщепление мРНК также обеспечивает незащищенный 3' конец) происходит очень быстро.

Бактериальные РНКазы, участвующие в деградации мРНК

РНКазы Е

Описана у *E. coli*. Кодирована геном *rne*. Продукт гена – крупный белок (1061 аминокислотный остаток). активен в виде гомодимера. Белок можно разделить на три домена. В центре расположен богатый аргинином РНК-связывающий домен. N-концевой каталитический домен имеет слабую гомологию с рибосомным белком S1. Имеется также некоторая гомология между РНКазой Е и миозином.

Специфичность РНКазы Е по отношению к субстрату не очень четкая. В качестве консенсус-последовательности сайта предпочтительного узнавания был предложен пентануклеотид (A/G)AUU(A/U), однако по другим данным единственным ограничением по отношению к последовательности РНК является разрезание "слева" от динуклеотида AU в одонитевых участках молекулы. Еще одним ограничением является то, что РНКазы Е наиболее активно действует только в непосредственной близости от свободного 5' конца, причем это должен быть конец с монофосфатом. Наконец, двухцепочечная РНК резистентна к деградации РНКазой Е. Таким образом, для успешного расщепления субстрата РНКазы Е должна распознать специфический внутренний сайт и свободный 5' нуклеозидмонофосфат.

Экспрессия РНКазы Е находится под негативным контролем, причем регулятором является сама РНКазы Е, и контроль осуществляется за счет ее собственной РНКазной активности. В условиях эксперимента можно добиться 40-кратного различия в количествах *rne*-транскрипта за счет изменения клеточной концентрации функциональной РНКазы Е.

РНКазы III

РНКазы III (кодируемая геном *rnc*) была обнаружена у *E. coli* как эндорибонуклеаза, разрезающая двухцепочечные молекулы РНК. Разрез может быть одно- или двунитевым, что частично зависит от степени спаренности оснований вокруг сайта разрезания. Специфичность по отношению к конкретной последовательности контролируется негативно, т.е. присутствие ряда оснований в определенных позициях сильно ингибирует разрезание.

РНКазы III участвует в процессинге рРНК и деградации ряда мРНК, хотя стабильность большинства клеточных мРНК не изменяется у мутанта по РНКазе III. Инактивация *rnc* летальна у *B. subtilis*, но не летальна у *E. coli*.

РНКазы III - гомодимер из субъединиц размером 25.4 кДа. Фермент содержит четко выраженные РНК-связывающий и РНКазный домен. Экспрессия *rnc* авторегулируется (как и в случае РНКазы Е, каталитическая активность РНКазы III напрямую участвует в авторегуляции). Активность РНКазы III регулируется также и на посттрансляционном уровне путем фосфорилирования.

Полинуклеотидфосфорилаза

Кодируется геном *ppr*. Гомотример из субъединиц размером 77.1 кДа. Катализирует обратимый фосфоролиз полирибонуклеотидов с освобождением нуклеозиддифосфатов. Содержит два РНК-связывающих домена – один гомологичен некоторым эукариотическим гЯРНК, а второй – рибосомному белку S1. Фермент широко распространен у бактерий. Экспрессия полинуклеотидфосфорилазы, как и описанных выше РНКаз, находится под автоконтролем.

РНКаза II

Кодируется геном *rnb*. Как и полинуклеотидфосфорилаза, процессивно деградирует одонитевую РНК с 3' конца, однако делает это путем гидролиза, а не фосфоролита мРНК, освобождая нуклеозидмонофосфаты. Мономер с молекулярной массой 72.3 кДа. Содержит карбоксиконцевой РНК-связывающий S1 домен. Экспрессия РНКаза II находится в обратной корреляции с уровнем полинуклеотидфосфорилазы, что предполагает участие этих двух РНКаза в деградации матричных РНК друг друга

Активность обеих экзорибонуклеаз ингибируется элементами вторичной структуры, однако полинуклеотидфосфорилаза к такому ингибированию значительно менее чувствительна.

Мультибелковые комплексы деградации РНК.

При очистке РНКаза E из *E. coli* был обнаружен крупный мультибелковый комплекс – РНК-деградосома. Основными компонентами этого комплекса являются РНКаза E, ПНФаза и РНК-хеликаза RhlB (Рис. 17.4). Ассоциация РНКаза E с ПНФазой в одном комплексе дает прямое доказательство их кооперации при деградации мРНК. В составе комплекса также выделяется енолаза (гликолитический фермент) и (в субстехиометрических количествах) полифосфаткиназа PPK и шапероны DnaK и GroEL; роль этих компонентов в деградации мРНК неясна.

РНКаза E – крупный мультидоменный белок. Эндонуклеазная активность связана с N-концевым доменом. Этот же домен обладает дополнительной активностью, отвечающей за деградацию поли(А) и поли(У) хвостов. С-концевая половина белка взаимодействует с тремя основными компонентами деградосомы, RhlB, ПНФазой и енолазой. Таким образом, РНКаза E – сложный мультидоменный белок, N-конец которого является каталитическим, а С-конец выполняет роль каркаса, на котором собираются остальные компоненты деградосомы.

Несколько мультибелковых РНК-деградирующих комплексов, структурно и функционально гомологичных бактериальной РНК-деградосоме, описано у эукариот. Все эти комплексы отвечают за деградацию РНК в 3'→5' направлении. Комплекс, содержащий гомологи ПНФазы и РНКаза E, участвует в процессинге и деградации мРНК в хлоропластах шпината. Еще два комплекса описаны у дрожжей. Комплекс mtEXO, содержащий экзонуклеазу, сходную с РНКазой II из *E. coli*, деградирует интроны мРНК в митохондриях *Saccharomyces cerevisiae*. Экзосома *S. cerevisiae*, участвующая как в процессинге рибосомной РНК, так и в деградации мРНК, содержит пять 3'→5' экзорибонуклеаз, четыре из которых гомологичны РНКазе II или ПНФазе из *E. coli*. Человеческий гомолог дрожжевой экзонуклеазы Rpr4p был обнаружен в составе большого комплекса, что свидетельствует в пользу наличия экзосомы и в клетках животных.

РНК-хеликазы в деградации РНК

Идентификация РНК-хеликазы RhlB в составе бактериальной деградосомы явилась первым свидетельством активной роли РНК-хеликаз в деградации РНК. RhlB принадлежит к классу DEAD-боксов. Это семейство АТФ-зависимых РНК-хеликаз, имеющих 8 консервативных мотивов, включая аминокислоты аспартат (D), глутамат (E), аланин (A) и опять аспартат (D). Белки-члены этого семейства участвуют в разнообразных процессах, включая сборку рибосом, инициацию трансляции и сплайсинг РНК. В экспериментах *in vitro* функция RhlB в составе деградосомы была четко показана. Элементы вторичной структуры в РНК часто создают препятствия для продвижения таких ферментов, как ПНФаза. Показано, что присутствие RhlB в составе деградосомы стимулирует в АТФ-зависимой манере деградацию при помощи ПНФазы субстрата с выраженной вторичной структурой. RhlB "раскручивает"

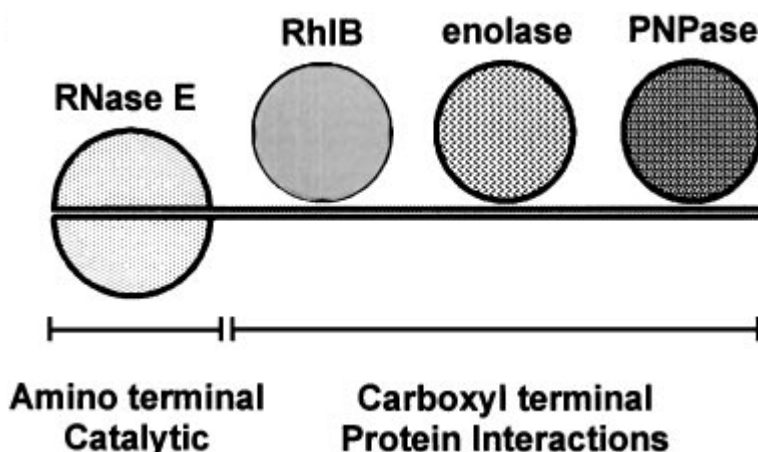


Рис.17.4. Прокариотическая РНК-деградосома

двухцепочечные участки РНК, что позволяет экзорибонуклеазе продвинуться дальше по субстрату. RhlB сильно активируется взаимодействием с С-концевой частью РНКазы E. Дрожжевые экзосома и комплекс mtEXO также имеют в своем составе хеликазы, подобные RhlB.

Полиаденилирование оказывает противоположный эффект на стабильность бактериальных и эукариотических мРНК.

Поли(А)-полимераза I (РАР I) из *E. coli* кодируется геном *pcnB* (plasmid copy number), который был первоначально идентифицирован по его действию на копийность плазмид с ColEI репликоном. РАР I участвует в деградации РНК I – небольшой регуляторной РНК, которая взаимодействует с РНК II – праймером, инициирующим репликацию ДНК ColEI. РНК I, время полужизни которой составляет 2 минуты, первоначально укорачивается РНКазой E на 5 нуклеотидов с 5' конца. Время полужизни полученного интермедиата (РНК I₅) возрастает в 10 раз в *pcnB* штамме (у которого отсутствует РАР I активность). *E. coli* имеет еще один белок с поли(А)-полимеразной активностью (РАР II). Инактивация обоих поли(А)-полимераз летальна. РАР I из *E. coli* гомологичен эукариотическим поли(А)-полимеразам.

Степень полиаденилирования бактериальных мРНК невысока, и у *E. coli* только небольшой процент всех транскриптов полиаденилирован. Однако, несмотря на низкую степень полиаденилирования, оно выполняет существенную функцию при деградации РНК. Добавление поли(А) способствует деградации РНК, чьи концы защищены от действия экзонуклеаз вторичной структурой. Такие экзорибонуклеазы, как ПНФаза и РНКазы I, нуждаются в одноцепочечном "хвосте", за который можно "ухватить" 3' конец мРНК и начать ее деградацию. Полиаденилирование 3' конца как раз и создает сайт связывания для экзорибонуклеаз.

Открытие дестабилизирующего влияния 3' поли(А)-хвостов на мРНК у бактерий явилось сюрпризом, поскольку у эукариот функция полиаденилирования противоположная (стабилизирующая). Такое отличие объясняется тем, что поли(А)-хвосты эукариот значительно длиннее и, кроме того, защищены особым белком РАВ (poly(A)-binding). Короткие не связанные с белком поли(А) последовательности и у эукариот оказывают дестабилизирующее действие на мРНК.

Литература:

1. M. Grunberg-Manago. Messenger rna stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages *Annu. Rev. Genet.* 1999. 33:193–227
