

РЕДОКС-СЕНСОРИ МІКРООРГАНІЗМІВ

В. І. ЛУЩАК

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: lushchak@pu.if.ua

В огляді узагальнені доступні на сьогодні дані літератури стосовно існування і функціонування редокс-сенсорів у мікроорганізмів. Зокрема, увага зосереджена на активації пероксидом водню білка *OxyR* і супероксид-аніоном білка *SoxR* у бактерії *Escherichia coli* та пероксидом водню і супероксид-аніоном системи білків *Orp1-Yap1* у дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*). Обговорюються подібні і відмінні властивості у сприйнятті сигналу оксидативного стресу у про- та еукаріотів.

Ключові слова: оксидативний стрес, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *OxyR*, *SoxR*, *Yap1*.

Відтоді, як було започатковано концепцію оксидативного стресу [1–4], постало питання, як організми відповідають на збільшення стаціонарної концентрації активованих форм кисню (АФК). На сьогодні вже досить багато відомо про молекулярні механізми відповіді клітин на оксидативний стрес. Він виникає тоді, коли збільшується генерація АФК чи знижується потужність систем їхньої деградації або ці два процеси відбуваються одночасно. В кінцевому результаті створений дисбаланс призводить до підвищення стаціонарної концентрації АФК. Збільшення її спричинює істотну перебудову метаболізму клітини і її адаптивної відповіді. Врешті-решт оксидативний стрес може призвести до загибелі клітини. Одним із важливих шляхів, насправді універсальним, відповіді на дію оксидативного стресу є підвищення антиоксидантного потенціалу. При цьому нерідко зростає як концентрація низькомолекулярних антиоксидантів, наприклад трипептиду глутатіону, так і високомолекулярних, зокрема антиоксидантних (супероксиддисмутази, пероксидази) і функціонально пов'язаних з ними ензимів (глутатіонредуктази, глутамілцистеїнсинтази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази тощо). Оскільки збільшення активності антиоксидантів і пов'язаних з ними ензимів відбувається, переважно, на транскрипційному рівні, то зрозумілий інтерес до запитання: а як оксидативний сигнал «відчувається» клітиною?

Уперше відповідь на таке запитання було отримано на мікроорганізмах, а саме на найкраще вивчених представниках прокариотів — ентеробактеріях (*Escherichia coli*) і еукаріотів — пекарських дріжджах (*Saccharomyces cerevisiae*).

Значною мірою цьому сприяло те, що вони, з одного боку є найдетальніше вивченими організмами, а з іншого (що пов'язане з першою причиною) для них розроблені дуже потужні і відносно недорогі молекулярно-біологічні підходи. Саме на результатах досліджень, проведених на цих одноклітинних організмах, ми і сконцентруємо увагу: проаналізуємо молекулярні основи того, як вищенаведені організми «відчувають» сигнал оксидативного стресу і як надалі він трансформується клітиною для підвищення антиоксидантного потенціалу. Ми сфокусуємо також увагу на білках-сенсорах *E. coli* — *OxyR* і *SoxR*, що координують відповідь на підвищення концентрації пероксиду водню (H_2O_2) і супероксид-аніона ($O_2^{\cdot-}$) відповідно, та сенсорів і ефекторів *S. cerevisiae* — *Grx3* та *Yap1*, які підвищують антиоксидантний потенціал у відповідь на дію декількох відомих індукторів оксидативного стресу, передусім на H_2O_2 . У *E. coli* білки *OxyR* і *SoxR* стимулюють експресію ензимів, які входять, відповідно, до регулонів *oxyR* та *soxRS*, а у *S. cerevisiae* білки *GPX3* і *YAP1* координують відповідь стимулону *YAP1*.

OxyR — сенсор на пероксид водню в *E. coli*

Після того, як було встановлено, що оброблення *E. coli* пероксидом водню в низьких концентраціях підвищує толерантність бактерій до його летальних концентрацій [5], постало питання про те, як це реалізується на молекулярному рівні. Виявилось, що низькі концентрації H_2O_2 збільшують активність антиоксидантних ензимів, а також деяких інших, зокрема пов'язаних з антиоксидантним захистом, або навіть і таких, які, на перший погляд,

не мають відношення до метаболізму АФК [5,6]. Зусиллями G. Storz та колег, а також іншими дослідниками було виявлено, що відповідь на індукований H_2O_2 -стрес координується порівняно невеликим білком із молекулярною масою 34 кДа, який отримав назву OxyR [7,8]. Надалі досить детально був вивчений механізм дії цього регуляторного білка. Він конститутивно експресується у клітинах *E. coli*, але з підвищенням стаціонарної концентрації H_2O_2 його транскрипційна активність істотно збільшується. Набір генів, що координується білком OxyR отримав назву oxyR-регулону.

Отже, під час індукції H_2O_2 окислативного стресу у клітинах стрімко (в межах 5 хв) після зростання концентрації пероксиду водню підвищується активність ензимів, що належать до складу oxyR-регулону. Назагал, до нього відносять декілька десятків різних білків, але ми акцентували увагу на тих, що, як принаймні вважається нині, підвищують толерантність бактерій до пероксиду водню. Серед них є гідроксипероксидаза I (HPI – кодується геном *katG*) і глутатіонредуктаза (кодується геном *gorA*). Перший ензим катаболізує широкий спектр органічних пероксидів, а також пероксид водню. Немає сумніву, що збільшення активності HPI має адаптивний характер, оскільки ензим катаболізує пероксид водню і багато органічних пероксидів. Глутатіонредуктаза відновлює окислений глутатіон, який є антиоксидантом, а також слугує донором відновних еквівалентів для багатьох глутатіонзалежних ензимів, наприклад глутатіонпероксидази,

глутатіонтіоредоксинів тощо. Зрозуміло, що глутатіонредуктаза також відіграє певну роль у широкому спектрі пристосувальних реакцій бактерій, а не тільки до окислативного стресу. Варто відзначити також, що oxyR регулює експресію алкілгідропероксидредуктази (ген *ahpCF*), неспецифічного ДНК-зв'язувального білка (ген *dps*), регулятора поглинання заліза (ген *fur*) і глутаредоксину (*grxA*) [5,7,8]. Тепер ми маємо достатньо даних, щоб дати певну відповідь на поставлене запитання. Схематично, механізм клітинної відповіді *E. coli* наведений на рис. 1. Білок OxyR водночас відіграє роль сенсора H_2O_2 і його ефектора, тобто він «відчуває» не лише зміну концентрації пероксиду водню, а й безпосередньо зв'язується із промоторами ефекторних генів і сприяє асоціації з ними РНК-полімерази.

Білок OxyR активується внаслідок окислення пероксидом водню залишку Cys¹⁹⁹ до сульфоксидної форми з наступним утворенням внутрішньомолекулярного дисульфідного зв'язку з Cys²⁰⁸ [9]. Окислення OxyR зумовлює певні конформаційні зміни в молекулі. Хоча відновлена форма його і зв'язується з ДНК, але лишень окислений OxyR збільшує експресію ефекторних генів. Таким чином, він стає активатором транскрипції. Робить він це через ефективніше зв'язування РНК-полімерази із промоторними ділянками генів oxyR-регулону. Недавно С. Lee та колеги [10] установили, що утворення дисульфідного зв'язку в молекулі OxyR дестабілізує білок і прискорює конформаційні зміни в молекулі з утворенням від-

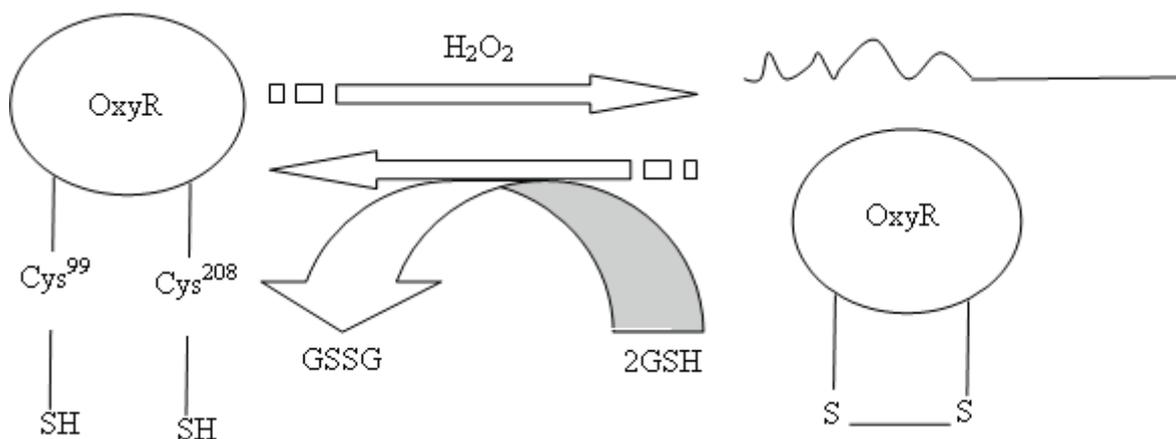


Рис. 1. Одноциклова редокс-регуляція транскрипційного фактора OxyR *E. coli*. Цей білковий фактор окислюється пероксидом водню з утворенням внутрішньомолекулярного зв'язку і, зв'язуючись із промоторами відповідних генів, підвищує їхню експресію. Інактивіація транскрипційного фактора здійснюється шляхом відновлення дисульфідного зв'язку глутатіонзалежним глутаредоксином. Редокс-потенціал пари $OxyR_{ок.} \rightleftharpoons OxyR_{відн.}$ становить -185 мВ

новленої форми. Цей процес також ефективно регулюється, а відновлення *oxyR* каталізується спеціальним ензимом — глутаредоксином 1 [9,11]. Регуляція за умов тіол-дисульфідної рівноваги може бути досить «вигідною» для клітини, оскільки здатна забезпечити зворотність процесу та інтегрувати регуляторні процеси як із загальним пулом, так і зі статусом клітинних запасів GSH і NADPH (відношенням окисленої і відновленої форм) [12,13]. Нещодавно було опубліковані дані, які свідчать, що транскрипційна активність *oxyR* контролюється залишком Cys¹⁹⁹, а похідні з різним ступенем окислення сірки характеризуються істотною різницею як у кооперативності відповіді, так і здатності зв'язуватися з ДНК. Оскільки глутаредоксин 1, який відновлює окислену форму *OxyR*, сам регулюється цим регуляторним білком, то це робить систему авторегуляторною [12].

Мінімальна концентрація H₂O₂, яка повністю окислює *OxyR* *in vivo*, становить близько 5 мкМ, а *in vitro* — від 0,02 до 0,05 мкМ [14]. Ці концентрації повністю відповідають субмікромолярним концентраціям H₂O₂, необхідним для залежної від активації *OxyR* конструкції *katG-lacZ* (гена β-галактозидази під контролем промотора гена *katG*, який кодує гідроксипероксидазу 1) *in vivo*. Результати досліджень передбачають, що два залишки цистеїну, задіяні в активації *OxyR* (Cys¹⁹⁹ та Cys²⁰⁸), відповідають за чутливість до концентрацій H₂O₂, які лише незначно перевищують його внутрішньоклітинну концентрацію у нормі. Зважаючи на те, що у клітинах *E. coli* концентрація GSH знаходиться на мілімолярному рівні, а концентрація *OxyR* значно нижча мікромолярної, слід очікувати високої специфічності реакції взаємодії між *OxyR* та H₂O₂. Однак дотепер ще не встановлені, механізми реалізації такої специфічності. Як було зазначено вище, вважається, що на першому етапі утворюється інтермедіат сульфенової кислоти (-SOH¹⁹⁹), що надалі атакує за нуклеофільним механізмом другу тіолову групу (Cys²⁰⁸) [14].

Опубліковані дані свідчать, що пероксид водню збільшує активність деяких ензимів *oxyR*-регулону і що дефект цього регуляторного білка перешкоджає розвитку адаптивної відповіді [15,16]. Інгібування біосинтезу білка антибіотиком хлорамфеніколом (левоміцетином) також блокує адаптивну відповідь, що підтверджує участь трансляції в цьому процесі.

SoxR — сенсор супероксид-аніона у *E. coli*

SoxR є транскрипційним фактором *E. coli*, який у відповідь на збільшення концентрації супероксид-аніона, а також деяких інших оксидантів, активує експресію одного гена — *soxS*. Обидві його форми — окислена і відновлена — зв'язуються із промотором ефекторного гена *soxS*, але тільки окислена форма активує експресію білка (рис. 2) [5, 17, 18]. У відповідь на зв'язування окисленого SoxR стрімко зростає концентрація іРНК *soxS*, а надалі і відповідного білка — SoxS. Останній, у свою чергу, зв'язується із промоторами відповідних ефекторних генів і сприяє зв'язуванню РНК-полімерази з ними, що, врешті-решт, приводить до біосинтезу білків, багато з яких є захисними ензимами. Так, зокрема, збільшується експресія низки генів: *sodA* (супероксиддисмутази, яка містить марганець), *zwf* (глюкозо-6-фосфатдегідрогенази), *fpr* [NADPH:флаводоксин (феродоксин) оксидоредуктази], *fldA* [флаводоксин 1 (феродоксину)], *fumC* (фумарази C), *asnA* (аконітази), *nfo* (ендоенуклеази IV) та *micF* (регуляторної РНК) [5]. Такі ензими, як супероксиддисмутаза і ендонуклеаза IV (вона задіяна в репарації ДНК) мають безпосереднє відношення до захисту клітини від оксидативного стресу, а глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа може постачати відновні еквіваленти NADPH для захисних механізмів. Окрім того, SoxR для захисту від АФК координує збільшення резистентності до антибіотиків, органічних розчинників та іонів важких металів. Групу генів, які регулюються білком SoxR, разом із SoxS, об'єднують у регулон *SoxRS* [5,19–21]. Цей регулон також важливий для толерантності *E. coli* до нітрозативного стресу, зумовленого оксидом азоту (NO) [5].

Білок SoxR є поліпептидом із молекулярною масою 17 кДа. На N-кінці він містить ДНК-зв'язувальний домен спіраль-поворот-спіраль (helix-turn-helix, НТН). У розчині білок утворює гомодимер, у якому кожен із мономерів містить редокс-активний [2Fe-2S]-кластер [19]. З допомогою направленого мутагенезу, було показано, що чотири консервативні цистеїнові залишки С-кінцевого домену є лігандами для кластера [2Fe-2S]. Ці кластери абсолютно необхідні для транскрипційної активності *soxR* як *in vivo*, так і *in vitro*. У відновленому стані один з атомів заліза має заряд 2⁺, а другий — 3⁺. Загальний заряд кластера — 1⁺ (рис. 3). При одноелектронному окисненні атом заліза Fe²⁺ перетворюється на Fe³⁺, що пе-

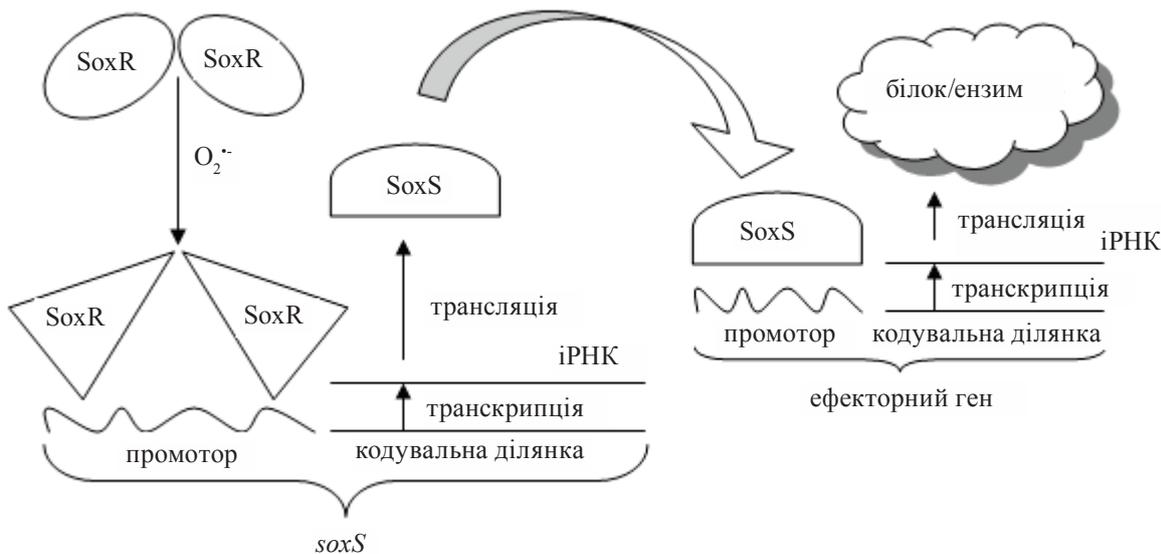


Рис. 2. Двоциклова регуляція відповіді *E. coli* на стрес, індукований супероксид-аніоном. Окислення білка SoxR спричинює певні конформаційні зміни в молекулах, унаслідок чого він набуває здатності збільшувати експресію гена *soxS*, що сприяє активації біосинтезу іРНК і білка SoxS. Унаслідок цього підвищується його концентрація у клітинах. Зв'язуючись із промоторами генів-мішеней, білок SoxS активує їхню експресію

ретворює цей кластер на кластер із загальним зарядом 2^+ . Оскільки зазначені кластери мають неспарені електрони, то їхні властивості можна вивчати методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР). Виявилось, що *in vivo* в аеробних умовах кластери $[2Fe-2S]$ SoxR, знаходяться, переважно, у відновленому стані, але дуже швидко окислюються за дії на клітині речовин, здатних до зворотних окисно-відновних реакцій, як, наприклад паракват [20]. Ці

дані свідчать, що саме кластери $[2Fe-2S]$ є редокс-перемикачами у процесі активації SoxR.

ЕПР-спектроскопія дає змогу дослідити і кінетику процесів окислення та відновлення кластерів $[2Fe-2S]$. При експозиції клітин бактерій в аеробних умовах до декількох структурно неподібних сполук, здатних до циклічного окислення-відновлення, як-то параквату чи фенозинметасульфату, виявили швидке окислення – протягом двох хвилин

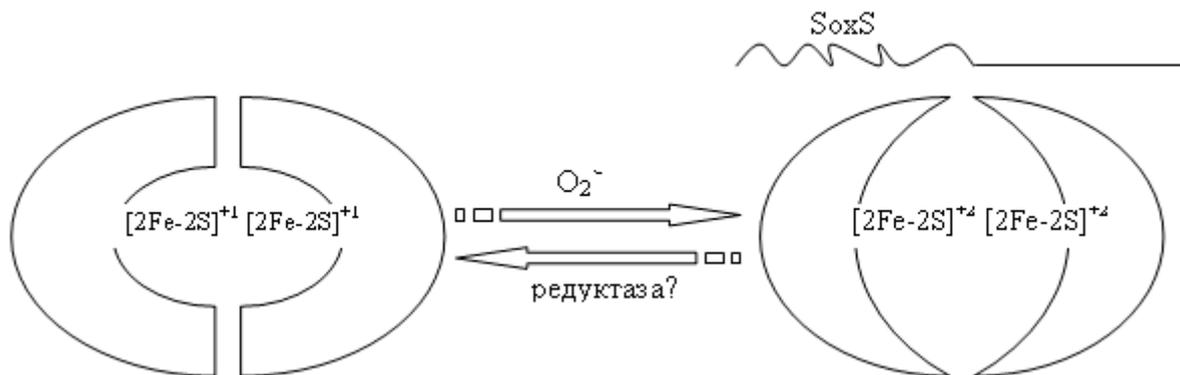


Рис. 3. Редокс-регуляція транскрипційного фактора SoxS ентеробактерії *E. coli*. Димерний білок SoxR окислюється супероксид-аніоном шляхом відняття електрона від кластера $[2Fe-2S]^{+1}$, що активує експресію гена *SoxS*. Інактивація цього транскрипційного фактора здійснюється шляхом відновлення кластера $[2Fe-2S]^{+2}$ редуктазою. Редокс-потенціал пари $SoxR_{ок.} \rightleftharpoons SoxR_{відн.}$ становить -282 мВ

[17]. Припинення дії оксидативного стресу на *E. coli* шляхом зупинки аерації призводить до дуже швидкого (протягом 5 хв) відновлення [2Fe-2S]-кластерів SoxR. Кінетичні зміни стану окиснення [2Fe-2S]-кластерів SoxR відбувалися водночас зі збільшенням або зменшенням транскрипції гена *soxS* – мішені для SoxR. Цей транскрипт істотно індукується (до 100 разів відносно стаціонарного рівня) протягом 2 хв після додавання параквату в аеробних умовах. Дію оксидативного стресу можна легко припинити, блокуючи аерацію, що призводить до швидкого зменшення концентрації іРНК SoxS протягом 20 хв до рівня в нестресованих клітинах [17].

Постає запитання: як речовини, що збільшують внутрішньоклітинну концентрацію $O_2^{\cdot-}$, окислюють залізосірчаний кластер білка SoxR? Оскільки цей процес супроводжується «споживанням» клітинних відновників [12], то незрозуміло, чи $O_2^{\cdot-}$ діє безпосередньо на SoxR, чи опосередковано, наприклад через зниження рівня NADPH. На сьогодні є аргументи на користь обох варіантів, але єдиної думки серед дослідників немає.

Залишається нез'ясованим також ще одне запитання: як в аеробних умовах білок SoxR підтримується у відновленому стані? Визначений експериментально редокс-потенціал кластера [2Fe-2S] становить 285 мВ [20]. Тому можна припустити, що відновлення SoxR пов'язане з редокс-пулом NADPH/NADP⁺, який має редокс-потенціал -340 мВ. Оскільки NADPH:флаводоксиноксидоредуктаза, флаводоксин I (редуктаза залізосірчаних кластерів білків) і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа входять до складу *soxRS*-регулону, то припускають, що SoxR відновлюється парою NADPH:флаводоксин та оксидоредуктаза/флаводоксин I з використанням NADPH. Це свідчить про авторегуляцію *soxRS*.

При інкубації клітин *E. coli* з пероксидом водню ми виявили підвищення активності супероксиддисмутази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази – компонентів регулону *soxRS* [21, 22]. Під час наших експериментів наприкінці 1990-х років вважалося, що ці ензими не активуються H_2O_2 . Хоча виявлена нами активація була не такою інтенсивною, як за дії фенозинметасульфату (речовини, якій в аеробних умовах притаманний оборотний процес окиснення), але вона надійно відтворювалась від досліду до досліду. Використовуючи інгібітор біосинтезу білка в бактеріях – хлорамфенікол, ми встановили, що для збільшення активності цих ензимів необхідний біосинтез білка. На-

далі постало запитання: яким чином H_2O_2 збільшує експресію зазначених ензимів – через білки-регулятори OxyR і SoxR або якимось іншим шляхом? Щоб відповісти на нього, ми використали штами бактерій, дефектні за тим чи іншим регуляторним білком. Виявилось, що H_2O_2 збільшує активність супероксиддисмутази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у штамі, дефектному за білком OxyR. При цьому ми не встановили збільшення активності ензимів регулону *oxyR* – НРІ та глутатіонредуктази, що підтверджує участь білка OxyR в активації зазначених ензимів. Згодом ми використали штамі, дефектний за білком SoxR. В цих експериментах ми не виявили активації СОД і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази пероксидом водню. Активувалися лишень НРІ і глутатіонредуктаза, що дозволило нормалізувати функціонування регулону OxyR. У штамі, дефектному за білком SoxR, фенозинметасульфат не активував ні супероксиддисмутази, ні глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, що свідчить про дефектність штаму за цим білком. Після завершення роботи рукопис статті було відправлено до міжнародного журналу, оскільки ми вважали, що описали новий факт. Через певний час отримали відмову у друкуванні роботи, бо ми не підтвердили одержані нами результати на рівні так званої експресії відповідних генів, тобто не визначили концентрацію іРНК. На той час ми не могли це зробити в Україні через відсутність належної експериментальної бази. Через рік з'явилась одна публікація в міжнародному журналі щодо збільшення експресії деяких генів *soxRS*-регулону за дії пероксиду водню [23], а трохи згодом ще одна подібна робота [24]. Дані з інших лабораторій частково не збігалися з нашими: так, зокрема, не було виявлено активації гена *zwf*, який кодує глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу. Ми опублікували результати цих досліджень тільки у 2005 р. [21,22], але вже цитуючи згадані вище роботи [23, 24], оскільки вони вийшли друком першими. Розбіжності в наших дослідах легко пояснюються тим, що кількісний рівень іРНК не завжди транслюється у відповідну кількість білка. Адже кінцевим продуктом, який, власне, і відповідає за адаптацію організму до тих чи інших чинників, є функціонально активний білок (ензим). При цьому відомо, що збільшення стаціонарної концентрації його автоматично не означає підвищення рівня зрілого білкового продукту. Зазвичай, стандартно визначають навіть не рівень експресії (швидкість синтезу) тієї чи іншої іРНК, а її стаціонарну концентрацію, тобто баланс між синтезом та

деградацією. Навіть збільшення стаціонарної концентрації білка не обов'язково свідчить про інтенсивніший його синтез, оскільки і на рівні іРНК можливе інгібування трансляції. А якщо згадати про досягання синтезованих пептидів, приєднання до апоензимів простетичних груп, зокрема гему в пероксидазах та іонів міді, цинку, заліза або марганцю в супероксиддисмутазах. Зрозуміло, що в ідеалі ті чи інші процеси метаболізму бажано вивчати на всіх доступних рівнях, особливо, якщо вони стосуються обміну речовин у живій клітині.

Yap1 – сенсор оксидативного стресу у *S. cerevisiae*

Білок Yap1 дріжджів, ймовірно, є найдетальніше вивченим регулятором транскрипції в еукаріотів, який «відчуває» редокс-статус клітини. Інкубація клітин *S. cerevisiae* з пероксидом водню зумовлює синтез багатьох білків/ензимів [25, 26]. Це супроводжується збільшенням концентрації окислених форм білків та ліпідів [27–30]. До білків, що окислюються, належить Yap1, який функціонує як ZFP-активатор транскрипції багатьох генів, що підвищує резистентність *S. cerevisiae* до оксидативного стресу [12]. Проте у дріжджів система відповіді на оксидативний стрес значно складніша порівняно з бактеріями. Власне, білок Yap1 не функціонує як первинний сенсор – він швидше ефектор і регулятор експресії відповідних генів, так званого стимулону YAP1 (рис. 4). Сам білок Yap1 у нормі міститься у клітинах у відновленій формі і відносно вільно розподіляється між цитоплазмою та ядром. Проте в ядрі він зв'язується своїм С-кінцем з ядерним білком – експортином Crm1 (який також називають Xrp1), що екпортує Yap1 з ядра. Тому за нормальних умов більша частина молекул Yap1 локалізується в цитозолі [31–33]. У окисленій формі Yap1-ділянку, яка відповідає за зв'язування з Crm1, заблоковано. Через це окислений Yap1 акумулюється в ядрі і збільшує експресію генів *SOD1* (Cu Zn-COD), *SOD2* (Mn COD), *CTT1* (цитозольна каталаза), *CTA1* (пероксисомна каталаза), *ZWR* (глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа 1), *GSH1* (глутамілцистеїнсинтаза – ключовий ензим біосинтезу глутатіону) [26,34]. За дії тіоредоксину 2 окислений Yap1 відновлюється і знову набуває здатності зв'язуватись із білком Crm1, унаслідок чого Yap1 екпортується з ядра. Тіоредоксин 2 відновлюється тіоредоксинредуктазою за рахунок окислення глутатіону. Але, як встановили А. Delaunay з колегами [35], власне сенсором пероксиду водню є інший білок – фосфоліпід-

пероксидаза Gpx3 (вона має ще назву Hup1 і Orp1 – oxidant receptor peroxidase). Цей білок за молекулярною масою (близько 20 кДа) і послідовністю амінокислотних залишків подібний до білків родини глутатіонпероксидаз. Він має три цистеїнові залишки, з яких H₂O₂ окислює Cys³⁶, утворюючи похідне сульфонової кислоти. Надалі окислений білок Orp1 взаємодіє з Cys⁵⁹⁸ білка Yap1, що зумовлює утворення міжмолекулярного дисульфідного зв'язку, ймовірно за нуклеофільним механізмом. Цей тимчасовий комплекс перебудовується з утворенням окислених продуктів із внутрішньомолекулярними дисульфідними зв'язками – Orp1 і Yap1. У Orp1 дисульфідний зв'язок утворюється між Cys³⁶ і Cys⁸², а у Yap1 – між Cys⁵⁹⁸ та Cys³⁰³. Наслідки такого окислення для Yap1 описані вище, а дисульфідний зв'язок у Orp1 відновлюється тіоредоксином із використанням глутатіону (рис. 4).

Варто зазначити, що білок тіоредоксин 2 (ген *TRX2*), який відновлює Yap1, входить до H₂O₂-стимулону, що забезпечує авторегуляцію процесів, які ми щойно проаналізували [36]. Якщо назагал порівняти схеми функціонування регулонів *oxyR* і *soxRS* у бактерій і H₂O₂-стимулону, який контролюється білками Yap1 і Orp1 у дріжджів, то неозброєним оком легко виявити істотну різницю. У бактерій білки *OxyR* та *SoxR* є одночасно редокс-сенсорами, і ефекторами, тоді як у дріжджів сенсорну роль відіграє білок Orp1, а ефекторну – Yap1. У функціонуванні останніх задіяний ще один білок – екпортин Crm1, оскільки місця, де клітина «відчуває» H₂O₂ і адекватно «відповідає» розмежовані у просторі через наявність ядра. Окрім того, для нормального функціонування системи Orp1–Yap1–Crm1 потрібен, щонайменше ще один білок, який забезпечує формування комплексу Orp1–Yap1 – Ybp1: так званий Yap1-зв'язувальний білок [37]. Ускладнює процес те, що в дослідах *in vitro* в разі окислення очищеного Yap1 на повітрі було виявлено утворення другого дисульфідного зв'язку – між Cys³¹⁰ і Cys⁶²⁹ [38], однак не з'ясовано, чи відбувається цей процес *in vivo* у клітині.

Слід зазначити, що Yap1 активує транскрипцію генів-мішеней неоднаково: залежно від типу оксиданту. Так, встановлено, що у відповідь на дію H₂O₂ і діаміду в молекулі Yap1 утворюються дисульфідні зв'язки між різними залишками цистеїну, а Orp1 не впливає на адекватність відповіді на дію діаміду [39–41]. Для активації транскрипції деяких ефекторних генів окислений Yap1 має утво-

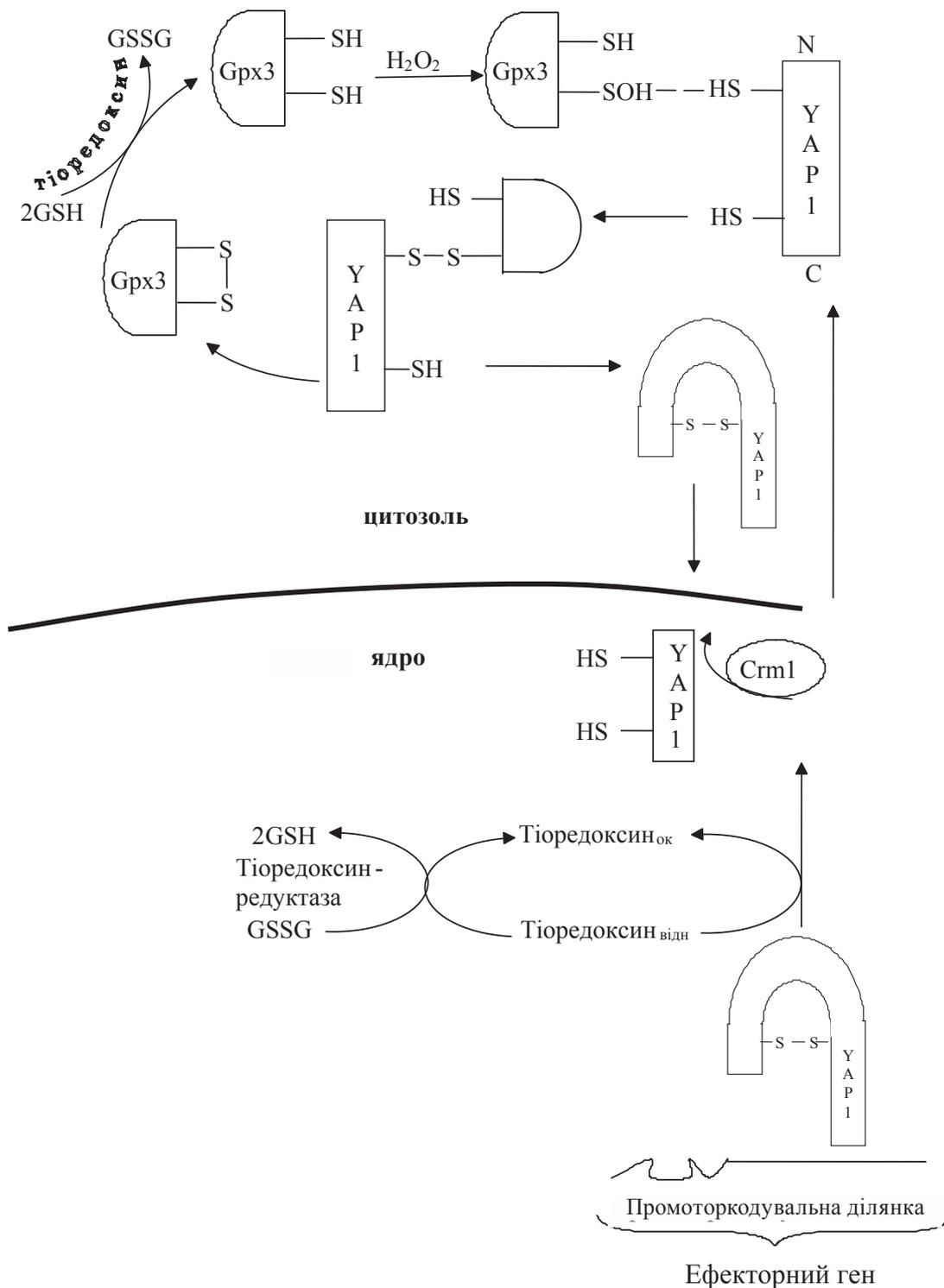


Рис. 4. Редокс-регуляція транскрипційного фактора Yap1 *S. cerevisiae*. На першому етапі пероксид водню окислює одну з тіолових груп Gpx3 – сенсора фосфоліпідпероксидази – з утворенням сульфоксидного похідного, яке надалі взаємодіє із залишком цистеїну білка Yap1, утворюючи міжмолекулярний дисульфідний зв’язок. Наступна ізомеризація зумовлює розщеплення комплексу з утворенням двох окислених білків із внутрішньомолекулярними дисульфідними зв’язками – Gpx3 і Yap1. Надалі окислений Gpx3 відновлюється за участю тіоредоксину з використанням глутатіону до вихідної форми, а окислений Yap1 дифундує до ядра, де він активує експресію ефекторних генів. За дії тіоредоксину 2 окислена форма Yap1 відновлюється і з допомогою білка Crm1 вивільнюється з ядра

рити комплекс з білком Ybp1. Виявилося, що продукт гена *YBP1* – білок Ybp1 – для стимуляції експресії генів-мішеней H_2O_2 через Yap1 має провзаємодіяти з Ybp1, але в цьому немає потреби за дії діаміду [12]. Тому зрозуміло, що редокс-регуляція транскрипційного фактора Yap1 зумовлюється не тільки його структурою, оскільки до процесу залучаються також додаткові цитоплазматичні та ядерні білки. Варто наголосити, що, подібно до функціонування SoxR у бактерій, Yap1 дріжджів бере участь у координації їхньої відповіді на нітрозативний стрес. У наших дослідах (стаття готується до друку) нітрозативний стрес, індукований донорами NO – S-нітрозоглютаціоном та нітропрусидом натрію – збільшує активність декількох антиоксидантних і пов'язаних з ними ензимів (супероксиддисмутази, каталази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази тощо). Цей ефект донорів оксиду азоту блокується інгібітором біосинтезу білка в евкаріотів – циклогексимідом, що свідчить про необхідність синтезу його *de novo*. Проте такої активації у штамі, дефектному за Yap1, виявити не вдалося, що може свідчити про участь білка в координації відповіді дріжджів на нітрозативний стрес.

Чи можна знання, отримані в дослідках з мікроорганізмами, перенести на вищі евкаріоти?

Це вічне запитання, яке завжди постає перед науковцями, які використовують в експериментах такі модельні об'єкти як *E. coli*, *S. cerevisiae* та інші мікроорганізми. Задають його також співробітники з фінансових інституцій і просто зацікавлені громадяни, оскільки вони хочуть знати, чи «не витрачаються на вітер» гроші платників податків. Однозначної відповіді, як завжди, немає, хоча хотілося б відповісти ствердно. Звичайно, мікроорганізми зручні і відносно дешеві в роботі. Крім того, нині не викликає сумніву висока консервативність багатьох клітинних біологічних структур і процесів, зокрема, реплікації, транскрипції, трансляції, загальної схеми організації метаболізму та ін. Саме тому у всіх цих випадках перші дослідження здійснювали на мікроорганізмах, і лише згодом шукали та досліджували аналогічні процеси вже у вищих евкаріотів. Такі проблеми були і виникають сьогодні в експериментах із редокс-сенсорами.

У цьому короткому огляді було показано, що утворення дисульфідних зв'язків задіяне у сприйнятті редокс-сигналу – збільшен-

ня стаціонарної концентрації пероксиду водню, яке подібне у бактерій (oxyR) та дріжджів (Orp1 і Yap1), хоча в евкаріотичному організмі система регуляції складніша. Клітини вищих евкаріотів, як і мікроорганізми, на оксидативний стрес відповідають підвищенням антиоксидантного потенціалу шляхом збільшення активності антиоксидантних ензимів та підвищення біосинтезу нових молекул: тобто регуляція відбувається на рівні експресії генів, до якої долучаються додаткові компоненти, зокрема посттрансляційні зміни – ковалентна модифікація.

У рослин, зокрема в *Arabidopsis thaliana*, збільшення експресії антиоксидантних ензимів у відповідь на оксидативний стрес, регулюється білками NPR1 і TGA1 [42–44]. У ссавців також описана адаптивна відповідь на дію оксидативного стресу, спричиненого підвищенням активності антиоксидантних ензимів [45–47]. Але в цьому випадку зв'язки між редокс-сенсорами і ефекторами можуть бути досить складними. Наприклад, адаптація білка NF- κ B пероксидом водню чи інтерлейкіном-1 β вимагає участі декількох протеїніназ і протеїнофосфатаз, одна з яких може бути сенсором [48–50]. Серед інших транскрипційних факторів ссавців, задіяних у відповіді на оксидативний стрес, слід назвати такі білки: проонкоген AP1 [51–53], раковий супресор p53 [54–56] і ін. Проте у цьому аспекті вчені знаходяться лишень на початку дороги, хоча механізми процесів, виявлені на бактеріях і дріжджах, дуже допомагають розкривати в інших організмах як загальні принципи, так і деталі сприйняття і передачі сигналів зовнішнього середовища.

РЕДОКС-СЕНСОРИ МИКРООРГАНІЗМОВ

В. И. Лушчак

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: lushchak@pu.if.ua

В данном обзоре обобщены данные собственных исследований и доступные на сегодня сведения, имеющиеся в литературе, относительно существования и функционирования редокс-сенсоров у микроорганизмов, в частности сосредоточено внимание на активации пероксидом водорода белка OxyR и супероксид-анионом белка SoxR у бактерии *Escherichia*

coli, а также пероксидом водорода белка и супероксид-анионом системы белков Orp1–Yap1 у дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). Обсуждено подобие и отличие восприятия сигнала оксидативного стресса у про- и эукариотов.

Ключевые слова: окислительный стресс, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, OxyR, SoxR, Yap1.

REDOX-SENSORS OF MICROORGANISMS

V. I. Lushchak

Vassyl Stefanyk Precarpathian National
University, Ivano-Frankivsk, Ukraine;
e-mail: lushchak@pu.if.ua

Summary

This review summarizes available literature data on the existence and operation of redox sensors of microorganisms. It is partially focused on the activation by hydrogen peroxide OxyR protein and by superoxide anion SoxR protein in bacteria *Escherichia coli* and the activation by hydrogen peroxide and superoxide anion of Orp1–Yap1 protein system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The similarities and peculiarities of redox signal sensing in pro- and eukaryotes have been discussed.

Key words: oxidative stress, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, OxyR, SoxR, Yap1.

1. Sies H. Oxidative stress. Academic Press, London. 1985.
2. Sies H. // J. Biochem. – 1993. – **215**. – P. 213–295.
3. Storz G., Tartaglia L. A., Ames B. N. // Science. – 1990. – **248**(4952). – P. 189–194.
4. Pero R. W., Roush G. C., Markowitz M. M., Miller D. G. // Cancer Detect Prev. – 1990. – **14**, N 5. – P. 555–561.
5. Demple B. // Annu. Rev. Genet. – 1991. – **25**. – P. 315–337.
6. Zheng M., Wang X., Templeton L. J. et al. // J. Bacteriol. – 2001. – **183**. – P. 4562–4570.
7. Storz G., Tartaglia L. A., Ames B. N. // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1990. – **58**(3). – P. 157–161.
8. Storz G., Tartaglia L. A. // J. Nutr. – 1992. – **122**(3). – P. 627–630.
9. Zheng M., Aslund F., Storz G. // Science. – 1998. – **279**. – P. 1718–1721.
10. Lee C., Lee S. M., Mukhopadhyay P. et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2004. – **11**(12). – P. 1179–1185.
11. Fernandes A. P., Holmgren A. // Antioxid. Redox Signal. – 2004. – **6**(1). – P. 63–74.
12. Toledano M. B., Delaunay A., Monceau L., Tacnet F. // Trends Biochem. Sci. – 2004. – **29**. – P. 351–357.
13. Michel B. // Toxicology Letters. – 2006. – **164**(1). – P. S5.
14. Aslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – **96**(11). – P. 6161–6165.
15. Kullik I., Toledano M. B., Tartaglia L. A., Storz G. // J. Bacteriol. – 1995. – **177**(5). – P. 1275–1284.
16. Mukhopadhyay S., Schellhorn H. E. // J. Bacteriol. – 1997. – **179**(2). – P. 330–338.
17. Greenberg J. T., Monach P., Chou J. H. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – **87**. – P. 6181–6185.
18. Pomposiello P. J., Demple B. Encyclopedia of Microbiology, 2nd / Ed. New York: Academic Press, 2000. – P. O78–O84.
19. Touati D. // Redox Rep. – 2000. – **5**(5). – P. 287–293.
20. Ding H., Demple B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – **94**. – P. 8445–8449.
21. Semchyshyn H. M., Bagnyukova T. V., Storey K. B., Lushchak V. I. // Cell Biol. Intern. – 2005. – **29**. – P. 898–902.
22. Semchyshyn H. M., Bagnyukova T. V., Lushchak V. I. // Biochemistry (Moscow). – 2005. – **70**. – P. 1238–1244.
23. Manchado M., Micha K., Pueyo C. // J. Bacteriol. – 2000. – **182**. – P. 6842–6844.
24. Zheng M., Wang X., Templeton L. J. et al. // J. Bacteriol. – 2001. – **183**. – P. 4562–4570.
25. Jamieson D. J., Rivers S. L., Stephen D. W. // Microbiology. – 1994. – **140**(12). – P. 3277–3283.
26. Godon C., Lagniel G., Lee J. et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**. – P. 22480–22489.
27. Reverter-Branchat G., Cabisco E., Tamarit J., Ros J. // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, N 30. – P. 31983–31989.
28. Cabisco E., Piulats E., Echave P. et al. // Ibid. – 2000. – **275**, N 35. – P. 27393–27398.
29. Mirzaei H., Regnier F. // J. Chromatogr A. – 2007. – **1141**(1). – P. 22–31.
30. Lushchak V. I. // Acta Biochim. Pol. – 2006. – **53**, N 4. – P. 679–684.
31. Kuge S., Jones N., Nomoto A. // J. EMBO. – 1997. – **16**, N 7. – P. 1710–1720.
32. Lee J., Godon C., Lagniel G. et al. // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**. – P. 16040–16046.
33. Delaunay A., Isnard A. D., Toledano M. B. // J. EMBO. – 2000. – **19**, N 19. – P. 5157–5166.
34. Jamieson D. J. // Yeast. – 1998. – **14**(16). – P. 1511–1527.
35. Delaunay A., Pflieger D., Barrault M. B. et al. // Cell. – 2002. – **111**, N 4. – P. 471–481.

36. Carmel-Harel O., Stearman R., Gasch A. P. et al. // *Mol. Microbiol.* – 2001. – **39**(3). – P. 595–605.
37. Veal E. A., Ross S. J., Malakasi P. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**(33). – P. 30896–30904.
38. Wood M. J., Andrade E. C., Storz G. // *Biochemistry.* – 2003. – **42**(41). – P. 11982–11991.
39. Thorpe G. W., Fong C. S., Alic N. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – **101**, N 17. – P. 6564–6569.
40. Kuge S., Arita M., Murayama A. et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2001. – **21**, N 18. – P. 6139–6150.
41. Нгуєкн D. T., Alarco A. M., Raymond M. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**(2). – P. 1138–1145.
42. Silverman F. P., Petracek P. D., Fledderman C. M. et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – **53**, N 25. – P. 9764–9768.
43. Mur L. A., Kenton P., Atzorn R. et al. // *Plant Physiol.* – 2006. – **140**(1). – P. 249–262.
44. Ndamukong I., Abdallat A. A., Thurow C. et al. // *Plant J.* – 2007. – **50**, N 1. – P. 128–139.
45. Mathers J., Fraser J. A., McMahon M. et al. // *Biochem. Soc. Symp.* – 2004. – **71**. – P. 157–176.
46. Nguyen T., Sherratt P. J., Pickett C. B. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2003. – **43**. – P. 233–260.
47. Love S. // *Brain Pathol.* – 1999. – **9**(1). – P. 119–131.
48. Foncea R., Carvajal C., Almarza C., Leighton F. // *Biol. Res.* – 2000. – **33**, N 2. – P. 89–96.
49. Bowie A., O'Neill L. A. // *J. Biochem. Pharmacol.* – 2000. – **59**, N 1. – P. 13–23.
50. Lee K. S., Buck M., Houglum K., Chojkier M. // *J. Clin. Invest.* – 1995. – **96**, N 5. – P. 2461–2468.
51. Lev S., Hadar R., Amedeo P. et al. // *Eukaryot. Cell.* – 2005. – **4**(2). – P. 443–454.
52. Ho E., Ames B. N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – **99**, N 26. – P. 16770–16775.
53. Maziure C., Conte M. A., Degonville J. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – **265**(1). – P. 116–122.
54. Bensaad K., Vousden K. H. // *Trends Cell Biol.* – 2007. – **17**, N 6. – P. 286–291.
55. Mercer J., Mahmoudi M., Bennett M. // *Mutat. Res.* – 2007. – **621**, N 1–2. – P. 75–86.
56. Horn H. F., Vousden K. H. // *Oncogene.* – 2007. – **26**, N 9. – P. 1306–1316.

Отримано 18.03.2008