

УДК 577.112:579.861.043:535.31

АНТИСТРЕССОВОЕ ПЕРЕКРЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ, АРХЕЙ И ДРОЖЖЕЙ (ОБЗОР)

© 2013 г. Л. И. Воробьева*, Е. Ю. Ходжаев*, Т. М. Новикова**, Е. М. Чудинова***

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, 119899

**Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, 119899

***Институт белка РАН, г. Пущино, 142290

e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Поступила в редакцию 12.12.2012 г.

В обзоре рассмотрены примеры специфических и глобальных ответов микроорганизмов и особенности стрессовых ответов с участием внеклеточных метаболитов сигнального действия. Обобщена информация о защитном и реактивирующем действии активных экзометаболитов представителей доменов бактерий, архей и эукариот и показаны междоменные перекрестные стрессовые ответы.

DOI: 10.7868/S0555109913040144

Ответ микроорганизмов на стресс вызывает большой интерес, поскольку их устойчивость к стрессам создает серьезные проблемы в антимикробной терапии и биотехнологии. Изучение и понимание стрессовых ответов прокариот относится к важнейшим аспектам фундаментальной биологии. Стресс — это любые изменения в геноме, протеоме или в окружающей среде, которые приводят к снижению скорости роста или способности к выживанию организма.

Стресс испытывают все формы жизни, если условия, в которых они обычно существуют, резко изменяются. Стрессовые ответы имеют особое значение для микроорганизмов, которые живут в изменяющейся окружающей среде, где происходят такие флуктуации, как суточные и сезонные изменения температуры, рН, осмотического давления и другие факторы. Стресс для обитателей водной среды и почв вызывают отсутствие пищи и дефицит таких элементов, как азот, фосфор и (или) железо.

Микроорганизмы располагают рядом адаптивных механизмов, обеспечивающих их существование в изменяющихся и зачастую стрессорных условиях окружающей среды. Помимо “классических” стрессорных ответов, были описаны механизмы, обеспечивающие генотипическое и (или) фенотипическое разнообразие микробных популяций, увеличивая шансы на выживание последних. Механизмы, основанные на стресс-индуцированном (адаптивный) мутагенезе известны у про- и эукариот. Известен феномен “генетической буферности”, проявляющийся в том, что возникшие под действием стрессов изменения в геноме зачастую фенотипически не проявляются и, следова-

тельно, не попадают под действие естественного отбора. Однако, если стрессорное воздействие столь сильно, что преодолевает “буферные” возможности организма, то доселе скрытая генетическая вариабельность становится видимой и доступной для факторов отбора [1]. Природа бережлива и полезные приобретения сохраняет в эволюции. Реакция на стрессы у самых древних обитателей Земли и у высших эукариот имеет большое сходство в отношении индукции классического механизма через образование внутриклеточных сигнальных (сенсорных) молекул, часто в ответ на повреждения молекул ДНК. Но микроорганизмы, обитающие в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды, обладают дополнительными средствами антистрессовой защиты с использованием внеклеточных метаболитов, которые защищают организмы от “привычных” и “незапланированных” стрессов.

Специфические глобальные ответы на стресс. Одна стратегия стрессовых ответов направлена на нейтрализацию и (или) избежание стрессового удара. Такие ответы уникальны для каждого стресса. Так, белки, необходимые бактериям для спасения от окислительного стресса, иные, чем белки, требующиеся для нейтрализации стресса от голодания. Стрессовые ответы такого типа называют специфическими [2]. К ним относят голодовый, окислительный, кислотный стрессы. Специфический ответ возникает при слабых стрессорных воздействиях.

Если воздействия стресса не удастся избежать, то это может приводить к повреждениям макромолекул (ДНК, белки, клеточные покровы), поэтому существует вторая стратегия, направленная

на предотвращение и репарацию повреждений клетки, что делает ее устойчивой не только к данному стрессу, но и к другим. Она называется глобальным стрессовым ответом [1, 2]. Глобальные стрессовые ответы возникают при летальных воздействиях. В процессе репарации белков участвуют белки-шапероны, отвечающие за правильную укладку синтезирующихся полипептидов и восстановление нативной конформации денатурированных белков. Ряд ферментов, индуцируемых стрессами, участвуют в репарации ДНК.

Основной механизм репарации ДНК, SOS-ответ, активируется разнообразными стрессами: облучение, голодание, окисление, воздействие антибиотиков и некоторые другие.

Покровы клеток защищает фермент D-аланин-карбокси-peптидаза, действие которой направлено на увеличение числа поперечных мостиков в пептидогликане и на продукты *rexA*-генов, которые защищают клеточные мембраны, усиливая синтез трегалозы. При летальных стрессах реализуются глобальные стрессовые ответы, которые происходят с включением коровых *Rex*-белков независимо от природы стресса, поэтому столкновение с определенным стрессорным фактором придает организму устойчивость к другим воздействиям. При адаптивных дозах неродственных стрессов клетки становятся устойчивыми к летальным дозам, что было показано в убедительных экспериментах Р. Рубари и соавт. [3, 4].

Переключение экспрессии клеточных генов на синтез характерного для стрессовых ситуаций белкового профиля включает ряд факторов: 1) δ -факторы (маленькие белки, которые связываются с РНК-полимеразой, коровым ферментом, и определяют промотор, узнающий холофермент), 2) дополнительные регуляторные молекулы (сАМР, ppGpp), 3) химические изменения определенных белков. Важную роль в стрессовых ответах играют δ^{70} , δ^s , δ^{32} , δ^{54} . Их холоэнзимы узнают соответствующие промоторы. Например, $E\delta^s$ контролирует 140 коровых генов, индуцированных стрессами, под контролем $E\delta^{32}$ находятся гены теплового шока и “голодовые” гены, δ^{70} функционирует главным образом в экспоненциальной фазе роста и при специфических стрессах. Стрессовые гены, которые транскрибирует $E\delta^{70}$, имеют слабые промоторы [2]. Поэтому транскрипция этих генов зависит от доступности дополнительных транскрипционных факторов, а именно сАМР. Другие молекулы с регуляторной функцией, ppGpp, оказывают положительное влияние на транскрипцию стрессовых генов.

Существует общее представление о “стрессосомах”, которые служат трансдуцирующими узлами, интегрирующими множественные стрессорные сигналы. В частности, была реконструирована и изучена молекулярная структура стрессосом

Bacillus subtilis. Оказалось, что они состоят из вирусоподобного капсидного стержня, снабженного сенсорными тяжами [5]. Было высказано предположение, что отдельные тяжи отвечают на различные сигналы, которые аккумулируются высококонсервативными доменами стержня [5]. При этом, эффективность стрессорного ответа, по-видимому, зависит от мощности физико-химического удара, испытанного клеткой. Стрессосомы были обнаружены во многих микробных филогенетических таксонах (филах, греч. *phyle* – племя), включая представителей *Methanomicrobiales*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteriodes* и *Deinococcus*.

Механизмы стрессовых ответов связаны с химическим изменением белков при работе двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции. Первый компонент – гистидинпротеинкиназа (ХПК), второй – респондирующий регулятор (РР). В ответ на специфический стимул стабилизируется фосфорилированная форма сенсорной киназы. Та, в свою очередь, фосфорилирует РР. Фосфорилированная форма РР активирует транскрипцию в месте мишени. ХПК из различных систем имеют на С-конце гомологичный участок, включающий около 100 аминокислотных остатков. Для РР характерна гомология домена примерно из 130 аминокислотных остатков на N-конце [6], что может обуславливать перекрестные реакции между разными организмами.

Стрессовые ответы с участием внеклеточных метаболитов. Классические работы Рубари [3, 4] с использованием штамма *Escherichia coli* 1829ColV положили начало изучению защиты бактерий от стрессорных воздействий при участии внеклеточных сигнальных соединений (сенсоры), главным образом, пептидной природы. В соответствии с представлениями автора [3], стресс распознается сенсорным экзометаболитом (ВСК, внеклеточный сенсорный компонент), который под действием стрессорных воздействий превращается (“активируется”) в индуктор (ВИК, внеклеточный индуцирующий компонент) и, взаимодействуя с клеткой, приводит к индукции устойчивости клетки к стрессу [7]. Таким образом, по Рубари, ВСК служат первоначальной мишенью стрессового воздействия.

В отличие от классической индукции в индукции, опосредованной внеклеточными метаболитами, выделяемыми неповрежденными клетками, возможно его превентивное действие. Поэтому неудивительно, что большая часть стрессовых ответов микроорганизмов связана с участием внеклеточных факторов [7]. Их называют аутоиндукторами. У грамотрицательных бактерий аутоиндукторами кворум-сенсинга служат главным образом ацилированные лактоны гомосерина (АГЛ), но могут быть и другие соединения, как циклические

дипептиды, метиловый эфир 3-гидроксипальмитиновой кислоты или 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон. Грамположительные бактерии в качестве аутоиндукторов используют пептиды, небольшие белки, аминокислоты. АГЛ гидрофобны и покидают клетку при простой диффузии, пептидные индукторы – гидрофильны и для их экскреции требуются специальные системы экспорта.

Клетки *E. coli* выделяют внеклеточные факторы x_1 и x_{11} , образующиеся в условиях стресса под действием N-этилмалеимида (N-ЭМ) [8]. Первый из них – x_1 обеспечивает прямую коллективную защиту клеток от литического действия N-ЭМ; фактор x_{11} , представлен сигнальными молекулами, которые выделяются в среду в условиях сильного стресса, вызывающего резкое снижение роста культуры. Фактор x_1 неустойчив при нагревании и хранении, а фактор x_{11} стабилен в этих условиях и, возможно, является средством межклеточной коммуникации. Однако природа и механизмы действия этих факторов пока не ясны.

Напротив, хорошо изучены свойства и функции внеклеточных белков семейства Rpf, обнаруженные в культуральной жидкости активно растущими клетками *Micrococcus luteus*. Основной функцией этих белков является восстановление колониеобразующей способности у некультивируемых клеток (“оживление”). Ген *rpf* был выделен и полностью расшифрован у продуцента, а также ряда других бактерий. Предполагается, что Rpf является ферментом, обладающим лизоцим-подобной активностью, а механизм его действия связан с модификацией клеточной стенки [9].

В наших исследованиях впервые было показано, что белковые экзометаболиты бактерий и дрожжей участвуют в реактивации клеток, подверженных действию различных стрессорных факторов (УФ-облучение, нагревание, окислительный стресс) [10–12]. С использованием тестерных штаммов, сконструированных на основе *E. coli* С600, несущих векторы с гибридными оперонами *umuD-lacZ* показана сигнальная функция длинноцепочечных алкилоксибензолов (С₁₂-АОБ) как алармонов – сигналов тревоги, контролирующих включение защитных функций организма [13].

Олигопептиды связываются с мембранными рецепторами, и сигнал передается на молекулы ДНК путем аутофосфорилирования рецептора сенсорной киназы (ХПК) и последующим переносом остатка фосфорной кислоты на респондирующий регулятор (РР). Фосфорилирование последнего приводят к его димеризации [14]. Димеризация увеличивает сродство РР с оператором, после связывания с которым следует соответствующий стрессовый ответ. Результатом каскадных реакций является индукция устойчивости клеток к стрессорному фактору (защита) и восстановле-

ние процесса деления инактивированных клеток (реактивация).

Малые белковые молекулы, легко диффундируя в окружающую среду, служат не только защитой популяции продуцента, но и соседних популяций микроорганизмов (перекрестный эффект). Сенсор взаимодействует с организмом во время или даже до стресса и при этом сенсорная молекула действует как внеклеточный коммуникатор, предупреждающий соседние клетки о возможной угрозе жизни. Это имеет огромное значение для поддержания гомеостаза микробных сообществ в стрессовых ситуациях, поэтому внеклеточные (олиго)пептидные молекулы являются незаменимыми участниками стрессовых ответов организмов.

Стрессовые ответы всех живых существ – высоко законсервированные физиологические ответы, функционирующие на всех уровнях жизни. Было показано сходство механизма сигнальной трансдукции у бактерий и человека [6]. Как и в случае нервной сети, в прокариотной сигнальной трансдукции параллельно работает значительное число трансдуцирующих путей. У *E. coli* функционирует больше 50 различных двухкомпонентных путей [15]. Множество путей обнаружено у различных штаммов молочнокислых бактерий. Показано их участие в ответах на различные стрессы [16]. Фосфорилированные РР могут быть стабильны от нескольких секунд до нескольких часов. Это дает организму нечто вроде памяти, и, как следствие, ответ клетки на действие специфического стимула будет зависеть от истории данной клетки в отношении этого типа стимула [6].

При максимальном стимуле сигнального переноса число сигнальных трансдуцирующих компонентов в клетке может увеличиваться в 10 раз, т.е. возможна аутоамплификация сигнальной трансдукции [6]. ХПК может фосфорилировать несколько молекул РР, а, в свою очередь, молекула РР может быть фосфорилирована несколькими ХПК. При этом образуются взаимосвязанные разветвленные перекресты, сходные с нейросетью.

Сходство механизмов дистресса у бактерий и высших эукариот подтверждено фактом функционирования химерного белка, собранного *in vitro* из сенсорирующего домена аспаргатного сенсора и цитозольной части инсулинового рецептора человека. Такой химерный рецептор активировал инсулиновый путь в эукариотических клетках [6]. Ключевой регуляторный механизм передачи сигнальной информации эукариотических клеток, включающий обратимое фосфорилирование остатков серина, треонина или тирозина в молекулах протеинкиназных рецепторов, обнаружен у ряда бактерий и архей [14]. Показано, что рост культур *E. coli* и *Saccharomyces cerevisiae* стимулируется внесением в среду гормонов человека дофамина и норадреналина [17].

Имеющиеся данные литературы указывают на высокую степень консервации стрессовых сигнальных путей у бактерий, дрожжей и высших эукариот. Это позволяет использовать клетки микроорганизмов как удобную модель для характеристики ответов на стрессы у более сложноорганизованных организмов.

***Luteococcus japonicus* subsp. *casei* как продуцент внеклеточных (олиго)пептидов с реактивирующими и защитными свойствами.** *L. casei*, грамположительные плеоморфные кокки диаметром в 1.5–2.0 мкм, были выделены нами из сыра и описаны ранее [18]. На основании фенотипических и молекулярно-биологических исследований было показано, что эти бактерии относятся к семейству Propionibacteriaceae, которое включает роды *Propionibacterium*, *Propioniferax*, *Micrococcus* и *Luteococcus*. Семейство включено в класс Actinobacteria, порядок Actinomycetales, подкласс Actinobacteridae [19]. От других членов семейства лутеококки отличаются высоким содержанием (до 90% всех кислот) мононенасыщенных длинноцепочечных жирных кислот. Другие члены семейства содержат в значительных количествах изо- и антеизо-разветвленные жирные кислоты.

L. casei – факультативные анаэробы, каталазо- и СОД-положительные, солеустойчивые организмы (растут при содержании NaCl вплоть до 6.5%). В качестве продуктов брожения они образуют пропионовую, уксусную и муравьиную кислоты. На поверхности плотных сред вырастают в виде блестящих колоний оранжевого цвета. При культивировании в жидких средах оседают на дно ферментера, видимо, в связи с образованием больших агрегатов поделившихся, но не разошедшихся клеток, окруженных слизистой капсулой, что видно на снимках в электронном микроскопе [20]. Бактерии хранятся в Российской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ-АС 1910.

Замечательным свойством *L. casei* служит выделение веществ пептидной природы, оказывающих защитное и реактивирующее действие как на клетки продуцента, так и на клетки других, далеких в филогенетическом отношении организмов. Вещества с реактивирующими свойствами, названные нами реактивирующим фактором (РФ) выделяют неповрежденные клетки в благоприятных условиях роста, в течение всего периода развития, при этом эффективность действия РФ находится в обратной зависимости от уровня выживаемости клеток, подвергаемых стрессорным воздействиям. При летальных интенсивностях стрессорных воздействий и выживаемости порядка 0.01–0.001% прединкубация суспензии клеток с РФ или бесклеточным фильтратом культуральной жидкости (КЖ) приводила к увеличению выживаемости в 3–10 раз [10–12, 21]. По-видимому, при стрессах летальной интенсивности происхо-

дит подавление синтеза как ферментов репарации ДНК, так и собственно РФ, поэтому клетки эффективно отвечают на РФ, внесенный извне.

Белковый РФ был выделен из КЖ путем ее пропускания через целлюлозный мембранный фильтр (“Millipore”, США, диаметр пор – 0.22 мкм) и последующего элюирования адсорбентов 3%-ным NaCl с последующим отделением клеток путем пропускания через фильтр с низким сродством к белку. Для стандартизации постановки экспериментов РФ выделяли из 100 мл КЖ и экстрагировали 2 мл раствора NaCl. Измерение содержания РФ было затруднено в силу его ничтожной концентрации.

Эффективность защитного или реактивирующего действия оценивали по соотношению титров КОЕ в суспензиях, инкубированных с КЖ (или РФ, см. далее) до или после стрессового воздействия, к титру КОЕ стрессированной культуры без пред- и постинкубации. Это соотношение обозначали как индекс деления (ИД). Учитывали также соотношение “живых” и “мертвых” клеток, определяемое после окрашивания препаратов флуоресцентным красителем Live/Dead (“Molecular Probes Inc.”, США). Оптимальное время реактивации составляло 10–15 мин при соотношении “суспензия клеток – КЖ” 1 : 1 (v/v) при 30°C. Защитное и реактивирующее действие РФ проявлялось при воздействии стрессорных факторов различной природы: нагревание, облучение УФ-светом, действие окислителей и активных форм кислорода [10–12]. При этом двухстадийный механизм действия в отношении стрессированных клеток продуцента был не характерен для РФ, в отличие от ВСК/ВИК-системы в *E. coli* [4, 21–23]. В работах Рубари и соавт. было показано, что для проявления индукционного действия, приводящего к возникновению устойчивости *E. coli* 1829 ColV к различного рода стрессам, белковый экзометаболит этого штамма должен быть обязательно активирован под действием нагревания или УФ-облучения. В случае РФ из *L. casei* активация не требовалась для проявления реактивирующего эффекта в отношении штамма-продуцента. Белковый метаболит *L. casei* проявлял широкую специфичность в отношении объектов его действия, клеток филогенетически далеких организмов. Перекрестный эффект был продемонстрирован на низших эукариотах, дрожжах [24] и грамтрицательных бактериях *E. coli* [21]. Причем в случае клеток *E. coli*, облученных УФ-светом, предварительная активация РФ в 3 раза увеличивала защитный эффект, но не оказывала заметного действия на реактивирующий эффект. На реактивацию облученных УФ-светом клеток дрожжей активация РФ влияния также не оказывала.

Параллельный учет “живых” и “мертвых” клеток прямыми микроскопическими методами по-

сле прокрашивания клеточных суспензий флуоресцентным красителем Live/Dead показал, что доля “живых”, “переходных” и “мертвых” клеток в исходной суспензии *S. cerevisiae* составляла 86, 10 и 4%, соответственно, а после облучения УФ-светом 53, 8 и 39%. После инкубации облученных УФ-светом суспензий с РФ *L. casei* в течение 15 мин при 28°C суммарная доля клеток, диагностируемых как “живые” (76%), была сопоставима с таковой в интактной суспензии при одновременном уменьшении доли “мертвых” клеток (8%).

В свою очередь *S. cerevisiae* образуют белковые экзометаболиты, выделенные из КЖ тем же методом, что и РФ *L. casei*. Показано, что при последовательном внесении вначале РФ дрожжей, а затем РФ лютеококков, эффективность реактивации УФ-облученных клеток *S. cerevisiae* (как объекта изучения перекрестного действия РФ) ниже, чем при внесении только РФ лютеококков, и проявляется так, как в присутствии только РФ дрожжей [12]. При обратной схеме внесения (РФ лютеококков, затем РФ дрожжей) в облученную суспензию клеток *S. cerevisiae* проявляется не суммарный эффект, а соответствующий РФ лютеококков. Иными словами, наблюдалась конкуренция РФ бактерий и дрожжей за мембранные рецепторы, что может иметь место при гомологичности белковых молекул или их доменов.

Препараты РФ лютеококков и *S. cerevisiae* имели сходные профили элюции при их очистке методом ВЭЖХ [24]. Спектры белков регистрировали на приборе Autoflex II (“Bruker”, Германия). Масс-спектральный анализ (MALDI-TOF) показал, что основной компонент РФ *S. cerevisiae* представлен белком с М.М. 5.8 кДа. Компонент с близкой массой присутствовал в препарате РФ *L. casei*. Не исключено, что наличие в составе РФ бактерий и дрожжей этого пептида может обуславливать перекрестные ответы у этих микроорганизмов.

Помимо указанного пептида, в составе РФ были обнаружены дополнительные пептидные факторы. В настоящее время проводится разделение белковой смеси в сочетании с тестированием биологической активности каждой фракции.

При изучении препаратов РФ были сделаны некоторые заключения о свойствах и механизмах их действия. РФ обладает типичными свойствами сигнальных молекул: синтезируется и аккумулируется в среде в ничтожных количествах, функционирует в очень низких концентрациях, проявляет дозозависимый эффект, достаточно термостабилен и устойчив при хранении [12]. РФ *L. casei* образуется конститутивно клетками, растущими в благоприятных условиях, и кривая зависимости защитного (реактивирующее) действия от количества вносимого РФ имеет S-образный характер [12], что предполагает кооперативный тип его

взаимодействия с клеткой и рецепторный способ передачи сигнала. В пользу мембранного механизма действия РФ свидетельствует быстрое (в течение нескольких минут) проявление стрессопротекторной активности РФ и влияние на его активность состояния цитоплазматической мембраны, меняющегося в зависимости от стадии развития микробных культур. При сравнительном анализе реактивирующего действия РФ на клетки лютеококков в логарифмической и стационарной фазе роста было показано, что РФ-опосредуемая реактивация клеток в первом случае в два раза выше, чем во втором.

При изучении механизма антистрессового действия РФ *L. casei* использовали изогенные штаммы *E. coli* с различными дефектами репарационных систем: Uvr A⁻, Rec A⁻, Pol A⁻ и штамм АВ 1157, клетки которых подвергали облучению УФ-светом высокой интенсивности [21]. У штамма Uvr A⁻ не функционирует эксцизионная репарация, имеющая первостепенное значение при репарации облученных УФ-светом клеток, но действует пострепликативная (рекомбинационная) и SOS-репарация. Штамм Pol A⁻ осуществляет эксцизионную репарацию, но более медленно, чем клетки “дикого” типа. Рекомбинационная и SOS-репарация функционируют у него эффективно. Штамм Rec A⁻ не осуществляет рекомбинационную и SOS-репарацию, сохраняя при этом активность эксцизионной системы репарации. У штамма АВ 1157 системы репарации ДНК не нарушены. Защитное действие РФ *L. casei* проявлялось в увеличении выживаемости облученных УФ-светом клеток Uvr A⁻, Pol A⁻ и Rec A⁻ соответственно в 15.7, 12.0 и 12.0 раз.

Предварительная активация РФ значительно увеличивала его защитный эффект только в отношении клеток “дикого” штамма АВ 1157. Выживаемость УФ-облученных, прединкубированных с РФ клеток была только в 2 раза выше, чем в контроле (необлученные клетки); напротив, после инкубации с РФ, предварительно облученного УФ-светом выживаемость штамма увеличивалась в 23 раза [21]. Различная реакция клеток “дикого” штамма и мутантов на “активированный” РФ, по-видимому, связана с различиями в структуре рецепторов цитоплазматической мембраны. Но у всех мутантов, независимо от типа используемой репарационной системы, под действием РФ происходит многократное увеличение числа КОЕ у защищаемых им клеток. Можно сделать вывод, что действие РФ не направлено на интенсификацию репарационных систем, функционирующих в клетках мутантных штаммов, поскольку, независимо от типа повреждения, наблюдалось сходное защитное действие РФ.

Схожесть протекторного эффекта РФ в отношении «дикого» штамма и репарационных му-

тантов позволяет связывать его действие с участием в общей для клеток функции — репликации. Деление клеток *E. coli* не начинается, пока не устранятся повреждения ДНК, а ингибитором клеточного деления служит белок Sul-A. Транскрипция гена *sul-A* индуцируется в условиях стресса при SOS-ответе. Продукт этого гена ингибирует образование Z-кольца до завершения репарации ДНК [25].

Приведенные выше факты, касающиеся условий и механизма действия РФ, были проверены и подтверждены на специально сконструированном штамме. Он был создан на основе *E. coli* C600 и содержал гибридный оперон *umuD-lac-Z* [26]. Ген *umuD* кодирует низкоточечную полимеразу PolV и участвует в осуществлении SOS-ответа. Реперный ген *lac-Z* это ген β -галактозидазы. При возрастании дозы облучения УФ-светом, приводящей к образованию однонитевых разрывов ДНК, в клетках штамма, несущего оперон *umuD-lac-Z* увеличивается количество фермента β -галактозидазы, что свидетельствует о реализации SOS-ответа. Активность оперона *umuD-lac-Z* подтвердила предположение о наличии протекторного дозозависимого действия РФ *L. casei* на облученные УФ-светом клетки *E. coli*. При пересчете активности β -галактозидазы на количество оставшихся жизнеспособными клеток оказалось, что уровень экспрессии гена *umuD* в них возрастал на 2–3 порядка. Однако в клетках, предварительно инкубированных с РФ, этот уровень был значительно ниже. Таким образом, РФ отчасти подавлял характерную для *umuD* SOS-зависимую регуляцию и не являлся индуктором SOS-ответа клетки.

Данные, полученные с использованием сконструированного штамма, подтвердили заключения, сделанные при работе со штаммами, лишенными различных систем репарации ДНК. Но механизм антистрессового действия РФ пока остается неясным и требует дальнейших исследований.

Реактивирующее перекрестное действие внеклеточных метаболитов грам-отрицательных бактерий, архей и эукариот. Использование внеклеточных метаболитов в качестве зондов окружающей среды, по-видимому, широко распространено среди микроорганизмов и является скорее нормой, чем исключением. Ниже приведены результаты исследований грамотрицательных бактерий (на примере *E. coli*), низших эукариот (на примере дрожжей), архей и клеток млекопитающих (на примере клеток *HeLa*) в качестве продуцентов и (или) акцепторов пептидных сигналов-сенсоров, участвующих в индукционной защите и (или) подготовке организмов к столкновению со стрессом.

Клетки *E. coli* в качестве сенсоров используют также пептиды или малые белки, в отличие от других грамотрицательных бактерий, использующих главным образом N-ацил-гомосеринлактоны [27]. Большой вклад в изучение защитного действия пептидных экзосметаболитов *E. coli* был внесен Р. Роубари [3, 4]. Автором была показана двухстадийность защитного действия, перекрестное действие стрессорных факторов, индукция устойчивости к стрессам в результате предварительного слабого воздействия последних на клетки. Он также подчеркивал важность коммуникативного значения внеклеточного защитного фактора и его практическое значение для биотехнологии и медицины, поскольку способность энтеробактерий приобретать устойчивость к различным химическим и физическим стрессорным воздействиям, сохраняя жизнеспособность (как в природных условиях, так и при приготовлении пищи и кормов), может быть причиной заболеваний животных и людей.

Однако выделение и идентификация активного соединения проведена не была, и все исследования на сегодня были выполнены с бесклеточным супернатантом *E. coli*. В нашей работе [28] впервые был продемонстрирован реактивирующий эффект супернатанта (КЖ) различных штаммов *E. coli*: выживаемость штаммов, облученных УФ-светом, увеличивалась более, чем в 4 раза. Было показано, что биологическая активность КЖ связана с термолабильным веществом (ами) белковой природы, с М.М. менее 10 кДа. Реактивирующее действие КЖ штамма К-12 лишь незначительно усиливалось после активации нагреванием по сравнению с контрольной, интактной КЖ.

Выше было показано, что белковый экзосметаболит (РФ) *L. casei* обладает перекрестным реактивирующим действием в отношении низших эукариот — дрожжей, подвергнутых различным стрессорным воздействиям.

Защитное и реактивирующее действие РФ *L. casei* было показано и в отношении *E. coli* К-12. Причем его активация УФ-облучением и нагреванием увеличивала защитный эффект в 3 раза, но не оказывала заметного действия на реактивирующий эффект, аналогично тому, что было показано для белкового экзосметаболита *E. coli*. Это наблюдение может быть обусловлено модификацией как самого РФ, так и мембранных рецепторов объекта, подвергаемого облучению и нагреванию. Экзосметаболит(ы) *E. coli* не индуцировал защитный перекрестный эффект *L. casei*.

Заметное реактивирующее действие РФ *L. casei* в отношении облученных клеток *E. coli* позволяло предположить способность последних синтезировать аналогичное соединение, однако аналог этого белкового фактора в КЖ *E. coli* обна-

ружен не был, а реактивирующая активность последней была связана с супернатантом, полученным после отделения предполагаемого белкового фактора (РФ) из КЖ. Следовательно, белковые сенсоры *E. coli* К-12 и *L. casei* различаются в отношении своей локализации и свойств.

Физико-химическая характеристика внеклеточных факторов адаптации *E. coli* разных штаммов пока не получена, но имеющиеся данные показывают, что клетки штаммов логарифмической фазы роста выделяют в среду белковые соединения, обеспечивающие жизнеспособность популяции в стрессовых ситуациях. Белковые факторы, участвующие в химической коммуникации, синтезируются клетками *E. coli* в ничтожных количествах, имеют небольшую молекулярную массу и, следовательно, их синтез не связан с большими энергетическими и конструктивными затратами.

Низшие эукариоты, дрожжи *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* и *Candida utilis*, в обычных условиях роста выделяют в среду вещества пептидной природы не только защитного, но и реактивирующего действия [29]. Этим свойством обладают также представители других семейств, обитатели различных экотопов, имеющие важное практическое применение [30].

Аскомицетные дрожжи *Debariomyces hansenii* выделены из муравейника. Это соле- и кислотоустойчивые дрожжи, встречаются в морской воде, вареньях, сиропах и джемах, играют отрицательную роль в рассолах. Активные продуценты липидов, протеаз и инулиназ, хорошо усваивают лактозу и образуют большую биомассу при росте на молочной сыворотке [31].

Arthroascus shoenii — аскомицетовые дрожжи семейства Saccharomycetaceae, обитают на листьях дуба [31]. *Rhodotorula glutinis* — аспорогенные красные дрожжи семейства Stryptosaccaceae, фитобииоты, обитающие на поверхности листьев различных растений. Служат источниками внеклеточных протеаз, L-аспарагиназы (противораковое средство) и каротиноидов [31]. С использованием этих дрожжей разработан способ получения фенилаланинаммиаклиазы [32].

Phaffia rhodozyma — базидиомицетовые красные дрожжи, эпифиты, выделяются только из сокоотечений деревьев, максимальная температура роста 22°C. Единственные дрожжи, способные синтезировать каротиноид астаксантин, широко используемый в медицине, косметике и как кормовая добавка при выращивании лососевых рыб.

Yarrowia lipolytica, также дрожжи аскомицетового аффинитета семейства Dipodascaceae, изолированы с поверхности выделяющих соль листьев пустынных растений Ближнего Востока. Осмо-, соле- и щелочеустойчивый штамм дрожжей, в отличие от других представителей этого вида, способен к быстрому росту при щелочных

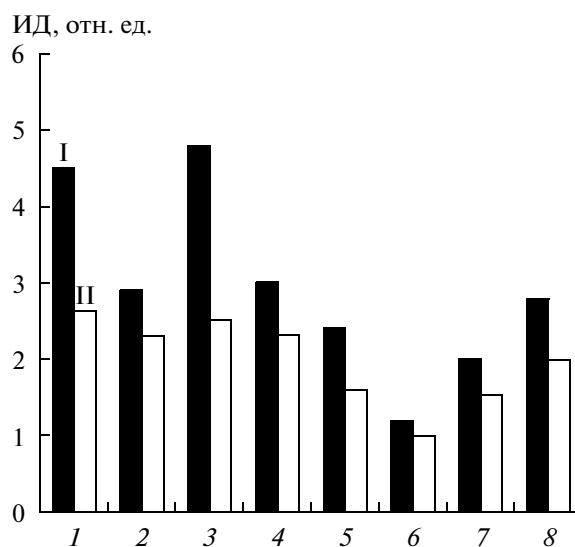


Рис. 1. Защитный (I) и реактивирующий (II) эффекты РФ, синтезированных различными штаммами дрожжей, на УФ-облученные клетки тех же культур (доза Дж/м²).

1 — *S. cerevisiae*; 2 — *C. utilis*; 3 — *K. lactis*; 4 — *D. hansenii*; 5 — *R. glutinis*; 6 — *A. shoenii*; 7 — *P. rhodozyma*; 8 — *Y. lipolytica*.

ИД — индекс деления, отн. ед.

значениях pH. Были предложены в качестве продуцентов лимонной кислоты из углеводов нефти, являются хорошим продуцентом липаз и протеаз [33].

Endomycopsis magnusii — аскомицеты, дрожжеподобные грибы, способные образовывать истинный мицелий, облигатные паразиты грибов.

Чувствительность клеток дрожжей к УФ-облучению снижалась в следующем порядке: *A. shoenii*, *D. hansenii*, *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *C. utilis*, *P. rhodozyma*, *E. magnusii*, *Y. lipolytica*, *R. glutinis*. Наибольшей устойчивостью обладали красные дрожжи *R. glutinis*, *P. rhodozyma* за счет высокого содержания каротиноидных пигментов и *Y. lipolytica*, выделенная из мест с высокой солнечной радиацией. К дрожжам, устойчивым к УФ-излучению, относятся также *E. magnusii*.

Из КЖ дрожжей выделяли антистрессовый белковый фактор по той же процедуре, что РФ лютеококков, как описано выше. Максимальный защитный и реактивирующий эффект дрожжевого РФ проявлялся при значениях выживаемости облученных дрожжей в интервале 0.01–0.05% [30]. Такой характер зависимости объясняется тем, что репарационные системы в клетках присутствуют в низких концентрациях, особенно ферменты репарации ДНК.

При слабом облучении (высокая выживаемость) индуцируются ферменты расщепления димеров тимина (главный продукт УФ-облуче-

ния) и активируются ферменты репарации. Летальные дозы облучения приводят к образованию такого количества димеров, при котором ферменты репарации подавлены, и именно такие клетки становятся наиболее восприимчивыми к внешним факторам реактивации. При более высокой выживаемости (20–50%) в качестве защитного механизма и повышения устойчивости клеток к стрессорным воздействиям могут использоваться алкилксибензолы (АОБ) [35], синтез которых связан с меньшими энергетическими и конструктивными затратами, чем синтез белков. АОБ синтезируют многие микроорганизмы, в том числе дрожжи *S. cerevisiae* и бактерии *L. casei*. Была показана индуцированная стрессом стимуляция синтеза С₇-АОБ [35]. С₇-АОБ – вещество фенольной природы, внесенное в суспензию *S. cerevisiae*, проявляло защитное, но не реактивирующее действие в условиях окислительного стресса и теплового шока [35].

На рис. 1 представлены данные по сравнительному защитному и реактивирующему действию РФ изученных дрожжей, откуда видно, что защитное действие превышало реактивирующее. Наибольшей эффективностью обладал РФ близких в систематическом отношении пищевых дрожжей *S. cerevisiae* и *K. lactis*. У дрожжей, выделенных из природных экотопов, особенно окрашенных штаммов *R. glutinis* и *P. rhodozyma*, действие РФ было менее выражено, по-видимому, в связи с наличием других природных защитных систем, например каротиноидов. Кроме того, в тех стрессовых условиях, в которых фактически обитают эти дрожжи в природе, в первую очередь, снижается синтез рРНК и рибосомных белков [36], поскольку синтез рибосом связан с большими энергетическими затратами. Более слабый рост дрожжей, выделенных из экстремальных экотопов, наблюдался и в наших исследованиях.

Ранее сообщалось о перекрестном действии РФ дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *L. casei*, а в составе РФ этих микроорганизмов были обнаружены пептиды с идентичной молекулярной массой [24]. В дальнейшем было показано перекрестное защитное и реактивирующее действие РФ разных дрожжей [29]. Причем перекрестная защита увеличивалась в 2–3 раза при активации (облучение) РФ, которая, впрочем, не влияла на реактивирующее действие. Наблюдение свидетельствует о нестрогой специфичности РФ, образованных *S. cerevisiae*, *K. lactis* и *C. utilis*, которая еще больше снижалась после их облучения. Возможно, при этом происходило изменение конформации пептида или каких-то его групп, что облегчало его узнавание и связывание с рецепторными белками цитоплазматической мембраны. В случае реактивации облученных клеток может происходить модификация не только сенсор-

ных молекул, но и рецепторов, что может снижать их средство.

РФ *S. cerevisiae* не проявлял киллерного или ингибирующего действия в отношении как дрожжей, так и грамположительных и грамотрицательных бактерий [29].

Использованные штаммы дрожжей имеют разнообразное биотехнологическое применение. В производстве (например, при получении этанола) дрожжи подвергаются воздействию ряда стрессорных факторов.

Использование природных протекторных факторов может увеличить выход полезных продуктов за счет снижения ингибирующего действия стрессоров на клетки продуцентов.

Археи. Археи впервые были использованы нами в качестве объектов, выделяющих метаболиты с антистрессовыми свойствами. Представителем домена архей были выбраны экстремальные галофилы *Haloarcula marismortui*, у которых обнаружен самозащитный фактор. Его прединкубация с суспензией клеток продуцента, подвергнутых кислотному стрессу, не только сокращала период их реабилитации, но и оказывала защитное действие на клетки дрожжей, инактивированных нагреванием.

Геном *H. marismortui* полностью расшифрован. В частности, было показано, что этот археон имеет хорошо развитый сенсорный аппарат и отвечает на различные изменения в окружающей среде [37]. Кроме сенсорно-рецепторных белков, в том числе гистидинкиназы, *H. marismortui* содержит большое число сенсорных трансдуцирующих белков и, по крайней мере, 43 индивидуальных белка входят в состав РР-домена, типичного для РР бактериальных двухкомпонентных систем. Спектр сенсоров сигнальных трансдукторов и транскрипционных регуляторов позволяет ощущать и подстраивать физиологию архей к резким изменениям в окружающей среде: высокому или низкому содержанию кислорода, жесткой радиации, возможному высыханию водоемов, снижению концентрации соли [38]. Из клеток *H. marismortui* выделен новый белок р45, который проявляет активность молекулярного шаперона только при низкой концентрации соли [37].

Суспензию клеток подвергали кислотному стрессу и в качестве стрессорного фактора использовали цитратный буфер, рН 2.6. Галоархеи не образуют жирных кислот, и при низких значениях рН их рост подавлен [39]. Использование традиционного метода количественного учета клеток по числу КОЕ в случае архей оказался неприемлемым. Из разведенных суспензий колонии на плотных средах не вырастали. Поэтому влияние протекторного фактора оценивали при сравнении скорости роста вариантов. В контрольном варианте рост культуры происходил без

лаг-фазы, и максимум накопления клеток наблюдали к исходу 48 ч. После этого наступала стационарная фаза, и к 72 ч часть клеток лизировалась. У культуры, выдержанной в течение 1 ч в цитратном буфере, pH 2.6, при последующем выращивании в питательной среде лаг-фаза продолжалась 48 ч с последующим едва заметным выходом культуры в рост (рис. 2). Прединкубация с бесклеточным фильтратом КЖ сокращала время лаг-фазы до 30 ч, после чего культура переходила к экспоненциальному росту, который продолжался и после 72 ч. Под действием кислотного стресса скорость роста культуры в экспоненциальной фазе (μ 0.013 ч⁻¹) снижалась в 3 раза по сравнению с контролем (μ 0.04 ч⁻¹), а прединкубация с КЖ сводила эту разницу до 2 раз (μ 0.03 ч⁻¹).

Таким образом, действие самозащитного фактора проявлялось в том, что период реабилитации у защищенных клеток наступал раньше, чем у стрессированных, но незащищенных, и можно предположить, что в культурах, инкубированных с КЖ перед кислотным стрессом, сохранялось больше жизнеспособных клеток, чем в незащищенных культурах.

Известно, что ряд фундаментальных молекулярных свойств архей сближают их с эукариотами, например, это касается аппарата репликации ДНК, транскрипции, трансляции, гомологии ряда белков теплового шока. У архей и эукариот присутствуют протеасомы, экзосомы, которых нет у бактерий [39]. Недавно у галоархей обнаружена каспазо-подобная активность фермента, участвующего в апоптозе эукариотных клеток [40].

Нами был обнаружен дополнительный факт, указывающий на родство архей и эукариот в отношении молекулярно-биологических свойств. Было показано, что активный фактор КЖ оказывает протекторное действие на клетки *S. cerevisiae*, подвергнутые нагреванию, увеличивая их выживаемость в 3 раза [41]. Инкубирование КЖ *H. marismortui* с протеиназой К не снимало ее протекторного действия, что служит косвенным указанием на небелковую природу протектора. В литературе описано несколько факторов, обладающих защитным действием, в том числе “химические шапероны” АОБ, обнаруженные в КЖ и клетках многих микроорганизмов, включая *S. cerevisiae* [42]. Эти стабильные соединения могут быть кандидатами на роль протектора и в случае архей.

Параллельный учет “живых” и “мертвых” клеток прямыми микроскопическими методами после прокрашивания клеточных суспензий дрожжей флуоресцентным красителем Live/Dead показал, что доля “живых” и “мертвых” клеток в исходной суспензии составила 88 и 12%, а доля после нагревания – 0.9 и 99% соответственно. Прединкубация суспензии дрожжей в течение 15 мин при 32°C с КЖ архей и последующего на-

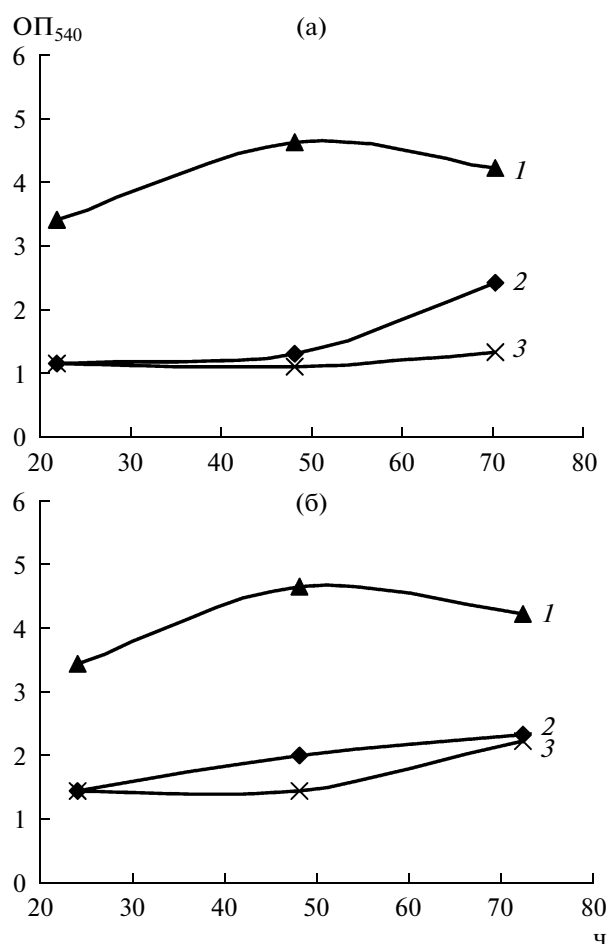


Рис. 2. Влияние pH на скорость роста культуры в контроле и в присутствии защитного фактора *H. marismortui*.

а – pH 2.6; б – pH 5.6. Контроль (1), обработка клеток цитратным буфером после прединкубации с защитным фактором (2) или 25% NaCl (3).

гревания приводила к увеличению доли “живых” клеток до 38% при одновременном снижении доли “мертвых” (55%); 5% составляли клетки с желтой флуоресценцией, состояние которых относят к переходному [41].

Низшие эукариоты, дрожжи *S. cerevisiae*, служат излюбленной моделью для изучения фундаментальных процессов молекулярной биологии. Существует множество примеров функционирования белков человека, экспрессированных в клетки дрожжей. Клеточный цикл дрожжей сходен с клеточными циклами всех соматических клеток, а половой процесс *S. cerevisiae* аналогичен репродукции человека [43]. В синтезе коротких нейропептидов эндорфинов принимает участие фермент, специфически расщепляющий предшественник гормона. Этот фермент был успешно замещен дрожжевым ферментом, расщепляющим предшественник дрожжевого пептидного гормо-

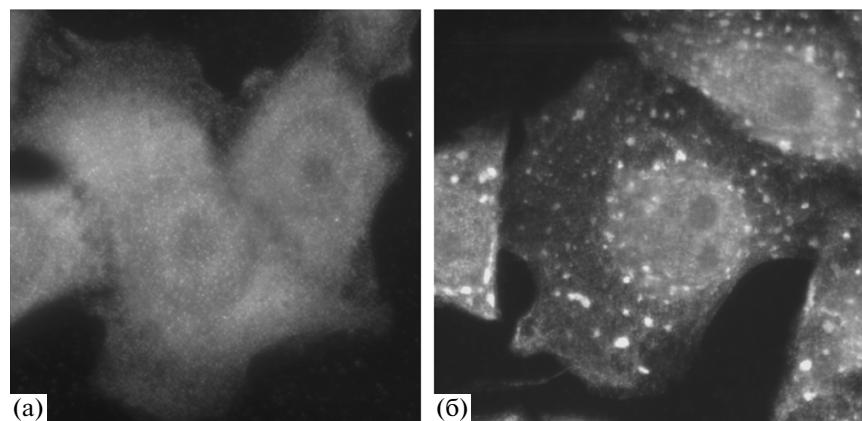


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к фактору IF3а intactных клеток *HeLa* (а) и клеток *HeLa*, обработанных 150 мкМ арсенитом натрия (б).

на α -фактора [43]. Будут ли клетки млекопитающих узнавать защитные белки дрожжей? В качестве мишени были использованы клетки *HeLa*.

На воздействие стрессорных факторов клетки *HeLa* отвечают образованием стрессовых гранул (СГ, рис. 3), которые выявляли методом непрямой флуоресценции с помощью антител к белкам, специфичным для СГ [44, 45]. Влияние РФ дрожжей на число клеток *HeLa*, содержащих СГ, проводили при возрастающих концентрациях арсенита. Полученные результаты представлены на рис. 4, из которого видно, что РФ дрожжевого происхождения снижал образование СГ только при незначительном стрессовом воздействии (50 мкМ арсенита Na). С увеличенной стрессовой нагрузкой защитные пептидные факторы в испы-

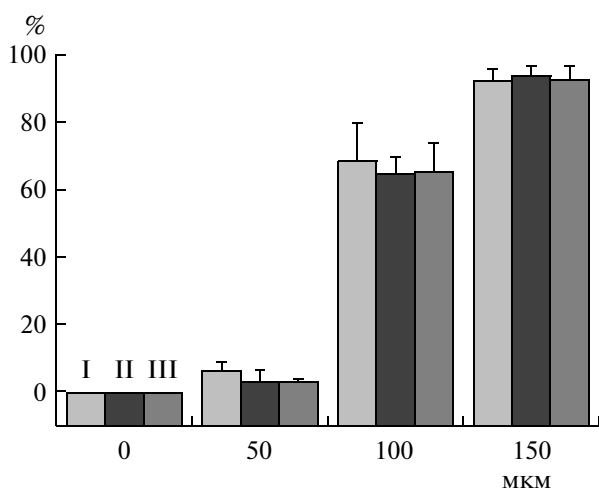


Рис. 4. Число клеток *HeLa* со стрессовыми гранулами (%) при инкубации с арсенитом натрия. I – intactные клетки, II – клетки, прединкубированные с РФ *L. casei*, III – клетки, прединкубированные с РФ дрожжей *S. cerevisiae*, выращенных в синтетической среде.

танных дозах не справлялись. РФ, полученный из дрожжевой культуры, выращенной на бедной среде, снижал образование гранул примерно на 30%. РФ, образованный культурой *S. cerevisiae*, выращенной на богатой среде, снижал образование гранул примерно на 20%. В дальнейшем планируется увеличение дозы защитного фактора и изучение его влияния на клетки высших эукариот, подвергаемых менее сильным стрессовым воздействиям.

В целом, полученные в работе результаты показывают широкие перекрестные стрессовые ответы среди представителей трех доменов жизни от бактерий до млекопитающих. Высокая степень эволюционной консервации стрессовых путей у бактерий, архей, дрожжей и высших эукариот означает, что прокариоты, и особенно низшие эукариоты, могут служить хорошей моделью для понимания стрессовых ответов у высших эукариот.

Впервые показано, что галоархеи, обладающие паразитической устойчивостью к экстремальным условиям за счет сильных репарационных систем и особенностей клеточной организации, также пользуются почти универсальным способом самозащиты и защиты других, отдаленных миллиардами лет от них живых организмов, путем образования внеклеточных метаболитов – зондов окружающей среды. Выделение и идентификация таких зондов – предмет наших дальнейших исследований.

Представленные в настоящей работе факты и наблюдения показывают, что реактивация и защита подвергнутых стрессу культур является распространенным явлением в мире про- и эукариот, а перекрестные реакции между стрессированными и нестрессированными популяциями – скорее норма, чем необычное событие, и ключевую роль в этих жизненно важных процессах выполняют олигопептиды.

Описаны разнообразные регуляторные функции олигопептидов в жизненно важных процес-

сах у высших организмов и в регуляции межвидовых взаимоотношений у прокариот [46].

При изготовлении продуктов, получаемых на основе жизнедеятельности дрожжей или смеси дрожжей и бактерий, возможна инактивация клеток микроорганизмов и повышение устойчивости к стрессорным воздействиям путем использования природных защитных факторов имеет важное практическое значение. Образование антистрессовых экзометаболитов клетками *L. casei* может способствовать увеличению жизнеспособности бактериальной закваски.

В свете имеющихся экспериментальных данных может быть поставлен вопрос о целесообразности включения *L. casei* в закваски для твердых и мягких сыров, созревающих с участием дрожжей, поскольку, как было показано, РФ *L. casei* оказывает перекрестное защитное и реактивирующее действие на стрессированные клетки дрожжей.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 13-04-00518).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aertsem A., Michiels C.W. // Crit. Rev. Microbiol. 2005. V. 31. № 1. P. 69–78.
2. Matin A. // Desk Encyclopedia of Microbiology. 2nd ed. / Ed. M. Schaechter. San Diego, CA: San Diego State Univ. 2009. P. 1075–1090.
3. Rowbury R.J. // Sci. Prog. 2003. V. 86. № 1–2. P. 139–156.
4. Rowbury R.J. // Sci. Prog. 2003. V. 86. № 4. P. 313–332.
5. Marles-Wright J., Grant T., Delumeau O., van Duinen G., Firbank S.J., Lewis P.J., Murray J.W., Newman J.A., Quin M.B., Race P.R., Rohou A., Tichelaar W., van Heel M., Lewis R.J. // Science. 2008. V. 322. № 5898. P. 92–96.
6. Hellingwert K.J., Postma P.W., Tommasen J., Westerhoff H.V. // FEMS Microbiol. Rev. 1995. V. 16. № 4. P. 309–322.
7. Rowbury R.J. // J. Appl. Microbiol. 2001. V. 90. № 4. P. 677–695.
8. Николаев Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 4. С. 387–397.
9. Волошин С.А., Капельяниц А.С. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1555–1564.
10. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Ponomareva G.M., Bryukhanov A.L. // Appl. Biochem. Microbiol. 2003. V. 39. № 2. P. 202–207.
11. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Ponomareva G.M. // Microbiology. 2003. V. 72. № 4. P. 482–487.
12. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Mulyukin A.L., Toropygin I.Yu. // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. № 5. P. 489–493.
13. Golod N.A., Loyko N.G., Lobanov P.V., Mironov A.S., Voyeykova T.A., Galchenko V.F., Nikolayev Yu.A., El-Registan G.I. // Microbiology. 2009. V. 78. № 6. P. 731–741.
14. Galperin M.Yu. // Desk Encyclopedia of Microbiology. 2nd ed. / Ed. M. Schaechter. San Diego, CA: San Diego State University, 2009. P. 1005–1021.
15. Estruch F. // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. № 4. P. 469–486.
16. El-Sharoud W.M. // Sci. Prog. 2005. V. 88. № 4. P. 203–228.
17. Олескин А.В., Кировская Т.А. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 440–445.
18. Воробьева Л.И., Турова Т.П., Краева Н.И., Алексеева А.А. // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 465–471.
19. Bergey's Manual of Systematic Microbiology // D.R. Boone, R.W. Gastenholz, eds. Baltimore: Springer, 2000. P. 164.
20. Vorobjeva L.I. Propionibacteria. Dordrecht–Boston–London: Kluwer Acad. Publ., 1999. P. 26–29.
21. Vorobjeva L.I., Fedotova A.V., Khodjaev E.Yu. // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. # 6. P. 567–573.
22. Rowbury R.J. // Novartis Foundation Symp. 1999. V. 221. P. 93–111.
23. Rowbury R.J., Hussain N.H. // Lett. Appl. Microbiol. 1998. V. 27. P. 193–197.
24. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Ponomareva G.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2005. V. 41. № 2. P. 150–153.
25. Margolin W. // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. № 4. P. 531–547.
26. Loyko N.G., Khodjaev E.Yu., Vorobjeva L.I., Kozlova A.N., El-Registan G.I. // Microbiology. 2013. V. 82. № 2. P. 139–146.
27. Rowbury R.J. // Sci. Prog. 1998. V. 81. № 3. P. 193–204.
28. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Ponomareva G.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2008. V. 44. № 2. P. 158–161.
29. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu. // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. № 2. P. 177–183.
30. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Vustin M.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. № 3. P. 264–269.
31. Квасников У.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология, пути использования. Киев: Наукова Думка, 1991. 300 с.
32. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. 219 с.
33. Звягельская Р.А., Перссон Б.Л. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1607–1615.
34. Walker G.M. // Yeasts. Desk Encyclopedia of Microbiology / Ed. M. Schaechter. N.Y.: Acad. Press, 2009. P. 1174–1188.
35. Конаныхина И.А., Шаненко Е.Ф., Лойко Н.Г., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 5. С. 571–575.
36. Gash A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. // Mol. Biol. Cell. 2000. V. 11. P. 4241–4257.
37. Franzetti B., Schoehn G., Ebel C., Gagnon J., Ruigrok R.W.H., Zaccari G. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 32. P. 29906–29914.

38. Baliga S., Bonneau R., Facciotti M.T., Min Pano, Glusman G., Deutsch E.U., Shannon P. // *Genome Research*. 2004. V. 14. P. 2221–2234.
39. Воробьева Л.И. Археи. М.: Академкнига, 2007. С. 103–170, 281–301.
40. Bidle K.A., Haramaty L., Baggett N., Nannen J., Bidle K.D. // *Environm. Microbiol.* 2010. V. 12. № 5. P. 1161–1172.
41. Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Новикова Т.М., Мухомкин А.Л., Чудинова Е.М., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. // *Микробиология*. 2013. Т. 82. № 6.
42. Батраков С.Г., Эль-Регистан Г.И., Придачина Н.Н., Ненашева В.А., Козлова А.Н., Грязнова М.Н., Золотарева И.Н. // *Микробиология*. 1993. Т. 62. № 4. С. 633–638.
43. Rine J. // *Amer. Zool.* 1989. V. 29. P. 605–615.
44. Shanina N.A., Ivanov P.A., Chudinova E.M., Severin F.F., Nadezhdina E.S. // *Mol. Biol.* 2001. V. 35. № 4. P. 544–552.
45. Ivanov P.A., Nadezhdina E.S. // *Mol. Biol.* 2006. V. 40. № 6. P. 844–850.
46. Замятнин А.А. // *Биохимия*. 2004. Т. 69. № 11. С. 1565–1573.

Antistress Cross-Effects of Extracellular Metabolites of Bacteria, Archaea, and Yeasts: A Review

L. I. Vorob'eva^a, E. Yu. Khodzhaev^a, T. M. Novikova^b, and E. M. Chudinova^c

^a Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

^b Belozerskii Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

^c Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Received December 12, 2012

Abstract—This paper reviews examples of specific and global responses of microorganisms and the characteristics of stress responses involving extracellular signaling metabolites. Information regarding the protective and reactivating effects produced by active exometabolites of representatives of domains of bacteria, archaea, and eukaryotes is summarized, and interdomain cross-responses to stressors are demonstrated.