

ЯВЛЕНИЯ ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ СМЕРТИ. ОРГАНИЗМ

В. П. СКУЛАЧЕВ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

PROGRAMMED DEATH PHENOMENA. ORGANISM

V. P. SKULACHEV

Phenoptosis, the programmed death of an organism, is the self-elimination of an individual for the sake of the community or population. Such phenomena have been described as taking place both among unicellular and higher organisms; they represent the last line of defense of a community (population) against epidemic diseases and asocial monsters with damaged genetic program.

Запрограммированная смерть организма, или феноптоз, представляет собой самоликвидацию индивидуума в интересах сообщества или популяции. Явления такого рода, описанные как у одноклеточных, так и у высших организмов, представляют собой последний рубеж защиты сообщества (популяции) от эпидемий или антисоциальных монстров с нарушенной генетической программой.

www.issep.rssi.ru

ВВЕДЕНИЕ

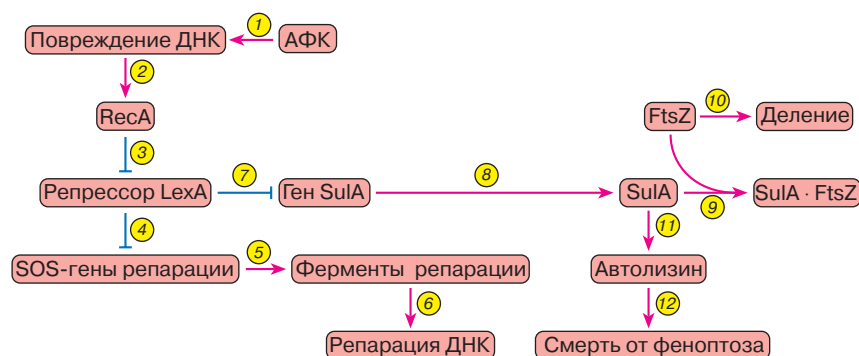
Представляется очевидным, что массовый апоптоз в жизненно важных органах должен привести к гибели всего организма. На первый взгляд это событие следует рассматривать как летальную патологию, имеющую для популяции только отрицательный смысл. Однако дело оказывается не столь однозначным, если организм, о котором идет речь, является членом семьи или сообщества других индивидуумов. Тогда можно представить себе ситуацию, когда альтруистическая смерть индивидуума принесет пользу группе индивидуумов, продолживших свой жизненный путь. Подобная групповая адаптация могла бы способствовать приспособлению популяции к меняющимся условиям внешней среды. В таком случае цепь событий митоптоз → апоптоз → органоптоз можно было бы в принципе дополнить еще одним этапом, и именно запрограммированной смертью особи. Явление такого рода предлагается называть феноптозом [1]. Феноптоз можно определить как способ очистки сообщества организмов от приносящих вред или просто ставших лишними индивидуумов посредством включения ими программы собственной гибели.

ФЕНОПТОЗ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Применительно к одноклеточным запрограммированную смерть клетки следует отнести к разряду явлений феноптоза. Уже совершенно ясно, что бактериальные клетки располагают несколькими программами самоубийства.

У бактерий, как и у животных клеток, имеется белок, осуществляющий мониторинг интактности ДНК. Его функция подобна таковой белка р53 эукариот. Белок бактерий называется RecA (рис. 1). Повреждение ДНК активирует RecA, который гидролизует другой белок-репрессор — LexA. Это ведет к дерепрессии генов, кодирующих SOS-белки репарации ДНК и белок SulA. Последний связывается с белком FtsZ, образующим

Рис. 1. Регуляция репарации ДНК, деления клетки и фенотоза у бактерий: 1 – повреждение ДНК активными формами кислорода (или иными воздействиями); 2 – активация белка RecA; 3 – RecA гидролизует белок-репрессор LexA, подавляющий экспрессию генов, кодирующих SOS-белки репарации (4), и гена белка SulA (7); 5 – образование SOS-белков, участвующих в репарации ДНК (6); 8 – образование белка SulA, который связывает другой белок – FtsZ (9), необходимый для клеточного деления (10), и активирует автолизин (11), вызывающий гибель клетки (фенотоз) (12) (по К. Льюису)



кольцо клеточного деления, так что размножение клеток становится невозможным. Оказалось, что мутант без гена *sulA* в 1000 раз менее чувствителен к некоторым способам повреждения ДНК, чем бактерия дикого типа. По Льюису, белок SulA помимо связывания FtsZ способен вызывать самоубийство бактерии путем активации автолизина – гидролазы пептидогликана, вещества, образующего стенку бактериальной клетки (см. [1]).

Упомянутые выше опыты показывают, что бактерия, обнаружив нарушения в своей ДНК, кончает с собой задолго до того, как эти нарушения достигнут такой степени, что жизнедеятельность бактериальной клетки окажется невозможной. Иными словами, при повреждении ДНК клетка гибнет потому, что воспринимает такое повреждение как сигнал к самоубийству, а не потому, что ДНК уже так сильно испорчена, что не может нормально функционировать. Такая стратегия еще одна иллюстрация сформулированного выше самурайского принципа “лучше умереть, чем ошибиться” [2], гарантирующего защиту генетической программы потомства от засорения нарушениями в ДНК, произошедшими у родителей.

В рамках схемы, показанной на рис. 1, легко представить себе, как организована такая защита. В ответ на повреждение ДНК прежде всего активируются SOS-системы репарации ДНК. Если тем не менее повреждения сохраняются, блокируется размножение поврежденной клетки. И лишь затем включается последняя линия защиты сообщества – система запрограммированной смерти бактерии [1].

Интересно, что можно искусственно остановить размножение бактерий пенициллином и это также ведет к активации автолизина и фенотозу. Был получен мутант пневмококка, у которого пенициллин по-прежнему тормозил активность ферментов, синтезирующих вещества бактериальной стенки, и тем самым останавливал размножение, но уже не вызывал гибели бактерий. В 2000 году Туоманен с сотрудниками установили,

что мутация произошла в гене, кодирующем один из двух белков, образующих двухкомпонентную регуляторную систему, в состав которой входят белки VncS и VnsR. Эта система необходима для активации автолизина под действием особого сигнального пептида, состоящего из 27 аминокислот (Perp²⁷). В норме Perp²⁷ обуславливает явление, названное микробиологами чувством кворума. Оно состоит в том, что в культуре размножающихся бактерий наступает массовый лизис клеток, если концентрация клеток в культуральной жидкости достигала некоторой критической величины. Оказалось, что пневмококки постоянно выделяют в среду определенные количества Perp²⁷. В логарифмической фазе роста это еще никак не сказывается на судьбе бактериальных клеток, так как концентрация Perp²⁷ слишком низка. Однако в стационарной фазе клеток становится достаточно много, чтобы концентрация Perp²⁷ достигла порогового значения, достаточного для включения механизмов запрограммированной смерти. Один из этих механизмов состоит в гидролизе стенки автолизином А. Как показали Туоманен с сотрудниками, существует также и какой-то другой фенотозный механизм, включающийся пептидом Perp²⁷, но не требующий автолизина А.

Как оказалось, продукция Perp²⁷ пневмококком может возрастать также и в логарифмической фазе роста бактерий. Для этого достаточно добавить ингибитор какой-либо ферментной системы, имеющей ключевое значение для жизнедеятельности клетки. Так происходит при блокаде пенициллином синтеза веществ клеточной стенки. Тот же эффект наблюдается, если вместо пенициллина взять ванкомицин или какой-либо другой антибиотик, токсичный для пневмококка.

У *E. coli* описаны три типа самоубийства, происходящего в ответ на заражение клетки бактериофагами. Один из них состоит в том, что в бактериальной мембране образуется канал, проницаемый для ионов. Два других основаны на блокаде белкового синтеза из-за

активации протеазы, расщепляющей рибосомальный белок EF-T_u, или рибонуклеазы, гидролизующей одну из транспортных РНК, а именно лизиновую. Очевидно, что самоубийство бактерии, вызываемое фагом, полезно для бактериального сообщества, которое таким способом очищается от клеток, инфицированных этим фагом. Дело в том, что бактерия кончает с собой на ранней стадии заражения, то есть еще не успев стать источником инфекции для популяции. Это происходит тотчас после проникновения фага внутрь клетки¹.

Совсем недавно фенотоз был описан у одноклеточных эукариот. К.-У. Фрелих с сотрудниками сообщили, что у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* небольшие количества H₂O₂ вызывают сжатие клеток, появление фосфатидилсерина во внешнем липидном слое плазматической мембраны, конденсацию хроматина и его перемещение к краю ядра и, наконец, расщепление ядерной ДНК. Все эти явления типичны для апоптоза многоклеточных. Ингибитор белкового синтеза препятствовал развитию перечисленных эффектов.

Запрограммированная смерть обнаружена и у простейших. Так, добавление стауроспорина к клеткам *Tetrahymena* вызывает морфологические изменения, напоминающие таковые при апоптозе животных клеток, где это вещество тормозит ферменты — протеинкиназы. Показано также, что ингибитор транскрипции актиномицин Д блокирует эффект стауроспорина [1].

ЯВЛЕНИЯ ФЕНОПТОЗА У МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Описано много примеров запрограммированной смерти (фенотоза) многоклеточных организмов, размножающихся только один раз в жизни. У некоторых из них само строение тела таково, что смерть имаго наступает вскоре после его рождения и репродуктивного акта. Вспомним поденку. Имаго этого насекомого не может есть, так как отсутствует полноценный ротовой аппарат, а в кишечнике гуляет воздух. Или другой пример. У клеща *Adactylidium* потомство прогрызает себе путь на волю из тела матери, вызывая ее гибель.

Однако гораздо чаще при половом акте или тотчас вслед за ним включается поведенческая или биохимическая программа самоубийства. Так, самец одного из видов кальмаров тонет тотчас после спаривания с самкой, которой он подсаживает под кожу свой спермато-

фор — мешочек со сперматозоидами. Самки некоторых видов пауков поедают при спаривании самцов, с которыми они до этого вполне мирно сосуществовали. Бамбук живет 15–20 лет, размножаясь вегетативно, а затем зацветает и гибнет сразу же после созревания семян. Тихоокеанский лосось умирает после нереста, причем происходит это не из-за крайнего истощения организма во время длительного путешествия вверх по реке, как думают многие, а вследствие включения особой биохимической программы, в которой ключевую роль играют стероидные гормоны. Лосось не умрет, если затормозить образование этих гормонов в коре надпочечников.

Роль фенотоза не так бросается в глаза, когда мы имеем дело с многократно размножающимися организмами. Здесь мы находимся в самом начале пути, который, как можно полагать, приведет к пониманию истинного положения вещей. Тем не менее следует рассмотреть эту проблему, поскольку она может иметь прямое отношение к важнейшим проблемам медицины.

ЗАГАДКА ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА

Очевидно, что животное, сильно инфицированное опасным патогеном, — столь же нежелательный гость в сообществе себе подобных, как заразившаяся фагом клетка *E. coli* в бактериальной колонии. С “надорганизменной” точки зрения быстрая смерть такого индивидуума могла бы стать последней, жестокой, но радикальной мерой предотвращения эпидемии. Вот почему сообщество организмов, располагающее таким способом самоочистки от инфицированных особей, должно получить репродуктивные преимущества по сравнению с сообществом, лишенным подобного механизма.

Дифтерийный токсин образуется патогеном *Corynebacterium diphtheriae*. Это белок с молекулярной массой 60 000 дальтон. Белок состоит из двух частей, большая из которых узнается особым белком-рецептором, расположенным во внешней мембране клетки человека или животного. После связывания с рецептором меньшая часть (21 150 дальтон) белка токсина проходит в клетку и освобождается в ее цитоплазму. Здесь она начинает действовать как фермент, присоединяющий остаток АДФ-рибозы к дифтамиду, уникальному производному аминокислоты гистидина, имеющемуся в единственном числе в единственном внутриклеточном белке — факторе элонгации (EF-2), необходимом участнике белкового синтеза [3, 4].

Интересен путь превращения гистидина в дифтамид. Это происходит уже после синтеза полипептидной цепи EF-2 в результате действия системы по крайней мере из пяти специальных ферментов. АДФ-рибозилирование EF-2 полностью инактивирует этот фактор. Поскольку ферментативная активность фрагмента

¹ Парадоксально, что ингибитор бактериального белкового синтеза закодирован не в геноме собственно бактерии, а в геноме какого-то другого фага, интегрированного в бактериальный геном. К. Люис высказал остроумную гипотезу, что первоначально бактерия оказалась “полем битвы” двух различных фагов. Можно думать, что впоследствии такой механизм был эволюционно закреплен в качестве фенотозного механизма очистки популяции от бактерий, инфицированных фагом (см. [1]).

токсина, попавшего в клетку, достаточно высока, одной его молекулы хватает, чтобы остановить в этой клетке весь белковый синтез. Клетка гибнет, а если этот процесс принимает массовый характер, гибнет и весь организм [3]. На первый взгляд дифтерийный токсин — типичное биохимическое оружие, изобретенное бактерией для борьбы с макроорганизмом. Такое объяснение можно было бы принять, если бы удалось выяснить какую-либо роль дифтамида, иную, чем подвергнуться АДФ-рибозилированию в ответ на появление токсина в центросоме. Однако попытки найти АДФ-рибозилирование дифтамида при отсутствии токсина пока не дали убедительных положительных результатов. Не найдено каких-либо полезных функций и у самого дифтамида. Более того, получена линия животных клеток с мутантным EF-2, потерявшим способность к АДФ-рибозилированию. У них не обнаружено отклонений в биосинтезе белка или еще в каких-либо существенных параметрах. Зато дифтерийный токсин оказался для таких клеток совершенно безобидным.

Создается впечатление, что дифтамид — это мина замедленного действия, которую каждый из нас носит до тех пор, пока он не заразится дифтеритом. Парадоксальность ситуации получит свое объяснение, если предположить, что люди и животные используют в борьбе с эпидемией дифтерита ту же стратегию, что бактерии в борьбе с нашествием бактериофагов. Как сказано выше, механизм, предотвращающий массовое распространение одного из бактериофагов в популяции кишечной палочки, состоит в том, что при появлении бактериофага в клетке бактерии наступает фенотоз, поскольку инактивируется один из факторов белкового синтеза. Клетка погибает, а с ней и бактериофаг².

Следуя той же логике, смерть человека или животного под действием дифтерийного токсина есть механизм, позволяющий популяции избавиться от сильно инфицированного индивидуума. Вероятно, коринобактерия все равно погубила бы больного каким-то иным способом, но это произошло бы после гораздо более массового ее размножения в организме, сделавшем его опасным рассадником болезни. В таком случае уже не кажется удивительным наличие дифтамида в одном из важнейших наших белков. Можно полагать, что популяции организмов, не имевших этого вещества, просто вымерли от эпидемий дифтерита.

Принцип действия дифтерийного токсина далеко не уникален. Практически так же действует токсин *A*, образуемый *Pseudomonas aeruginosa* (единственное от-

личие состоит в том, что рецептором этого токсина служит иной белок, чем в случае дифтерита). По-видимому, дифтамидный механизм защищает популяцию не только от дифтерита, но и от целой группы опасных болезней.

Уже ясно, что это явление уходит своими эволюционными корнями далеко в глубь веков. Дифтамида нет у эубактерий, но он есть у архебактерий и дрожжей. Получены мутанты дрожжей без дифтамида. Они оказались устойчивы к дифтерийному токсину. Роль дифтамида у одноклеточных остается неясной.

По-видимому, высшие организмы, как и бактерии, располагают не одним, а несколькими механизмами фенотоза. Так, возбудитель дизентерии *Shigella dysenteriae* образует белок-токсин, проникающий внутрь клетки, чтобы блокировать работу рибосом, хотя в этом случае дело обходится без дифтамида [3].

Холерный токсин вызывает АДФ-рибозилирование особого G_s -белка, стимулирующего фермент аденилатциклазу, которая образует цАМФ — важнейший внутриклеточный регулятор. В результате G_s -белок переходит в состояние постоянной активности. Соответственно активируется и аденилатциклаза, вызывая стойкое повышение уровня цАМФ в клетке. При этом нарушается β -адренэргическая регуляция, что применительно к клеткам кишечного эпителия означает массовый выброс Na^+ и воды в просвет кишечника. Происходит сильнейшее обезвоживание и обессоливание организма, чреватое летальным исходом.

Возбудитель коклюша образует токсин, катализирующий АДФ-рибозилирование белка G_i , играющего роль ингибитора аденилатциклазы. Такой эффект ведет к стойкому уменьшению количества цАМФ и нарушению α_2 -адренорецепции. Кроме того, G_i теряет способность открывать K^+ -каналы в клеточной мембране.

Есть указания на то, что чумной токсин вызывает у грызунов нарушение β -адренорецепции клеток стенок кровеносных сосудов, ведущее к гибели животного из-за коллапса сосудистой системы организма. Последний пример особенно демонстративен, поскольку здесь уже мы не можем рассматривать токсин как простое оружие патогенной бактерии в ее борьбе с лейкоцитами. Чумной микроб в общем совсем не заинтересован в смерти макроорганизма, служащего для него средой обитания и размножения. Похоже, что и в этом случае мы сталкиваемся с альтруистическим поведением сильно инфицированной особи, жертвующей собой ради спасения популяции.

СЕПТИЧЕСКИЙ ШОК

Другим примером патологии, несущей черты фенотоза, является септический шок. Многие черты этой страшной болезни указывают на то, что наступающая в

² Интересно, что ген, кодирующий дифтерийный токсин, как и гены ингибиторов белкового синтеза, вызывающие фенотоз *E. coli*, находится в геноме бактериофага (он называется фаг β), присутствующем в клетках *Corynebacterium diphtheriae*, а не в самом геноме этой бактерии.

результате него смерть, как и в случае дифтерита, специально организована самим организмом, подвергшимся массивной бактериальной инвазии. При этом роль самих бактерий может быть совершенно пассивной. Так называемый эндотоксин, служащий причиной сепсиса, есть не что иное, как липополисахарид, образующий внешний слой клеточной стенки грам-отрицательных бактерий. Токсичность липополисахарида всецело зависит от наличия в макроорганизме: 1) специальных связывающих его внеклеточных белков и 2) других белков-рецепторов, узнающих белково-липополисахаридный комплекс. Рецепторы, о которых идет речь, расположены на внешней поверхности плазматической мембраны клеток пациента. Сепсис сопровождается массовым выбросом макрофагами фактора некроза опухолей и других цитокинов, индуцирующих апоптоз (рис. 2). Нокаутирование генов, кодирующих упомянутые выше белки, а также блокирование рецепторов липополисахарида или ингибирование каспаз снижают токсичность последнего. Можно думать, что путь к победе над сепсисом лежит через описание, а затем блокирование всех путей восприятия и передачи феноптозного сигнала, подаваемого бактериальным липополисахаридом, который сам по себе нетоксичен.

Липополисахаридный сигнал сообщает организму о появлении в крови и тканях грам-отрицательных бактерий — потенциально опасного класса микроорганизмов, обладающих мощной клеточной стенкой, которая предохраняет их от воздействия защитных антибактериальных механизмов человека или животного. Не случайно именно основной компонент этой стенки как раз и играет сигнальную роль. По-видимому, такого рода эффект есть ответ организма на любые грам-отрицательные бактерии, в том числе не способные передаваться от одного макроорганизма к другому. Это помогает объяснить, почему сепсис может быть вызван даже неинфекционными бактериями [1].

Безусловно феноптоз служит последней линией обороны сообщества от эпидемии. Если количество патогена в индивидууме не слишком велико, тот же сигнал (появление бактериального липополисахарида) используется организмом, чтобы привлечь лейкоциты к зараженному участку ткани. Здесь лейкоциты образуют под действием липополисахарида все тот же TNF и другие цитокины, посылая в апоптоз клетки зараженного участка.

При умеренном уровне инфекции все эти меры призваны спасти, а вовсе не убить организм. Вот почему ходячее мнение о сепсисе состоит в том, что он представляет собой чрезмерное использование организмом его защитных средств. Однако такая точка зрения не объясняет, почему эволюция так и не изобрела контрольного механизма, предотвращающего гибель особи из-за массового выделения цитокинов [1].

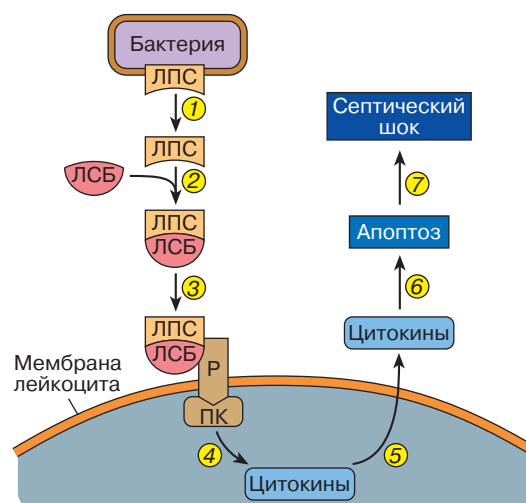


Рис. 2. Механизм септического шока: 1 – липополисахарид бактериальной стенки (ЛПС) освобождается в кровь или лимфу в результате распада попавших туда грам-отрицательных бактерий; 2 – ЛПС образует комплекс со специальным ЛПС-связывающим белком (ЛСБ); 3 – комплекс ЛПС-ЛСБ связывается с особым рецептором (Р) во внешней мембране лейкоцита; 4 – образование тройного комплекса ЛПС-ЛСБ-Р активирует протеинкиназу (ПК), запускающую каскад реакций, который завершается стимуляцией синтеза цитокинов; 5, 6 – цитокины выходят из лейкоцита и атакуют другие клетки, запуская в них программу апоптоза; 7 – массовый апоптоз клеток, образующих жизненно важные органы, вызывает септический шок, ведущий к гибели организма (феноптозу)

ЛИТЕРАТУРА

1. Скулачев В.П. Кислород и явления запрограммированной смерти: I Северинское чтение. 1999. М.: Биохим. о-во РАН. 48 с.
2. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: Роль активных форм кислорода // Соросовский Образовательный Журнал. 2001. Т. 7, № 6. С. 4–11.
3. Спирин А.С. Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высш. шк., 1986. С. 214–221.
4. Спирин А.С. Биосинтез белка: Регуляция на уровне трансляции // Соросовский Образовательный Журнал. 2000. Т. 6, № 5. С. 2–7.

Рецензент статьи Ю.А. Владимиров

Владимир Петрович Скулачев, директор Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, профессор, доктор биологических наук, действительный член РАН, лауреат Государственной премии СССР, премии им. А.Н. Баха Президиума АН СССР, почетный профессор МГУ. Основатель отечественной школы энергетики биологических мембран. В течение многих лет читает курс биоэнергетики для студентов биологического факультета МГУ. Автор фундаментальных работ по энергетике клетки, более 350 статей в российских и международных журналах, шести монографий и одного учебника.