

КАРБОНИЛЬНЫЙ СТРЕСС У БАКТЕРИЙ: ПРИЧИНЫ И ПОСЛЕДСТВИЯ

©2015 г. О. В. КОСМАЧЕВСКАЯ, К. Б. ШУМАЕВ,
А. Ф. ТОПУНОВ

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Защита от неферментативного гликирования.
III. Метилглиоксальный шунт. IV. Пути образования метилглиок-
саля. V. Регуляторные и сигнальные функции метилглиоксаля.
VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В начале 1990-х годов в научной литературе появился термин «карбонильный стресс» [1]. Под ним подразумевают возникновение дисбаланса между образованием активных карбонильных соединений (АКС) и их удалением. К АКС относят альдегиды и кетоны, содержащие электрофильный углерод карбонильной группы, способный вступать в реакцию с нуклеофильным азотом аминокислот, аминокислот и гуаниновых оснований, образуя N-замещенные гликозиламины (основания Шиффа). Последние подвергаются перегруппировке Амадори с образованием кетозаминов [2], которые являются предшественниками конечных продуктов гликирования (AGEs) – соединений различного строения, включая производные пиррола, пиразина, имидазола и фурана. Последовательность реакций, ведущая к образованию AGEs, впервые была описана французским биохимиком и врачом Maillard'ом [3] (реакция Майяра или

Принятые сокращения: АКС – активные карбонильные соединения; AGEs (Advanced Glycation End products) – конечные продукты гликирования; MG (methylglyoxal) – метилглиоксаль; MgsA – метилглиоксальсинтаза; GAPD – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа; GloI/GloII и GloIII – глиоксалаза I/II и III; DHAP – дигидроксиацетонфосфат; G3P – глицеральдегид-3-фосфат; GSH – восстановленный глутатион; Pi – неорганический фосфат; FBA (Flux Balance Analysis) – метод анализа метаболических потоков.

Адрес для корреспонденции: aftopunov@yandex.ru

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 13-04-00967, 14-04-017109, 15-04-08891) и РГНФ (грант 15-36-01024).

сахароаминная реакция). Детально её изучили американские химики Hodge и Rist [4].

Иранский ученый Rahbar [5] описал гликированный гемоглобин (HbA1c) в крови больных сахарным диабетом, что положило начало исследованию неферментативно гликированных белков и AGEs в биологических объектах, где уже идентифицировано более 20 активных альдегидов и кетонов, основными из которых являются глиоксаль, метилглиоксаль, 3-деоксиглюкозон, малоновый диальдегид. Метилглиоксаль (MG) представляет собой α,β -дикарбонильное соединение, гликирующая активность которого в 10000 раз превосходит активность глюкозы или фруктозы [6]. Образование этого α -кетоальдегида в различных тканях животных и человека было замечено в 1920-х годах прошлого столетия еще до начала активного изучения реакций неферментативного гликирования в биологических объектах. Английские ученые Rabbani и Thornalley ввели термин «дикарбонильный стресс» (dicarbonyl stress), тем самым, подчеркивая первостепенное значение α,β -дикарбонильных соединений в формировании AGEs в физиологических условиях [2, 6].

Со времени открытия неферментативное гликирование наиболее интенсивно изучалось у животных и человека, поскольку связано с развитием патологических процессов при диабете, раке, старении и нейродегенеративных заболеваниях. О карбонильном стрессе в бактериях сведений не так много. Было не вполне ясно, применимо ли вообще по отношению к бактериям понятие «карбонильный стресс». Обнаружение неферментативно гликированных белков в клетках *Escherichia coli* болгарскими учеными Мироновой с соавторами стало свидетельством того, что в бактериях, как и в эукариотах, идут процессы гликированием [7]. Следующим обратил внимание на наличие продуктов гликирования в бактериальной клетке Perreg [8].

Высокие уровни гликированных белков и нуклеиновых кислот, обнаруживаемые в экспоненциальной фазе бактерий с коротким жизненным циклом, показывают, что в процессе гликирования в прокариотах участвуют чрезвычайно реакционноспособные карбонильные соединения. Задолго до обнаружения в цитоплазме гликированных аддуктов была исследована способность бактерий синтезировать MG [9]. Затем был открыт и специфичный для прокариот фермент – метилглиоксальсинтаза (MgsA) (EC 4.2.99.11), катализирующий гидролиз дикарбонилсукцината (DHAP) до MG и неорганического фосфата (Pi) [9].

II. ЗАЩИТА ОТ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛИКИРОВАНИЯ

Поскольку при некоторых условиях в бактериях может образовываться MG, бактериальные клетки должны обладать эффективными механизмами борьбы с этим токсичным соединением. Токсичность MG обусловлена его способностью не только участвовать в ферментативном гликировании, но и генерировать свободнорадикальные продукты [10–14]. Также MG ингибирует процессы биосинтеза белка и инициации репликации ДНК [15].

Можно выделить три стратегии, обеспечивающие защиту бактерий от ферментативного гликирования: понижение концентрации α -кетоальдегидов, снижение реакционной способности карбониллов или аминов, ремонт или деградация макромолекул, модифицированных АКС. Эти стратегии в большинстве случаев дополняют друг друга, но самым мощным механизмом является эволюционно консервативная глиоксалазная система (Glo), регулирующая концентрацию MG.

Система Glo состоит из двух ферментов: глиоксалазы I (GloI, EC 4.4.1.5: S-D-лактоилглутатионлиаза) и глиоксалазы II (GloII, EC 3.1.2.6: гидроксацилгидролаза), кодируемых генами *gloA* и *gloB* [16–18]. Важной функцией Glo является детоксикация реакционноспособных α -кетоальдегидов (в основном MG) [19]. Субстратом для GloI является гемитиоацеталь, образующийся в спонтанной реакции MG с GSH. GloI катализирует необратимое превращение гемитиоацетала в S-D-лактоилглутатион, который затем гидролизует при участии GloII до D-лактата. Последний может либо выводиться из клетки, либо восстанавливаться D-лактатдегидрогеназами (EC 1.1.2.4) до пирувата [16, 19, 20]. У некоторых бактерий вместо глутатиона в качестве акцептора активных карбонильных групп могут быть использованы другие тиолы: бациллотиол [21, 22], микотиол [23], γ -глутамилцистеин [24], γ -глутамилцистеиновые пептиды [21, 25]. Максимальная экспрессия GloI приходится на экспоненциальную фазу при быстром росте бактерий, для которого необходима высокая скорость гликолиза [26, 27]. В физиологических условиях система Glo конвертирует MG с диффузионно-контролируемой скоростью [28, 29], благодаря чему внутриклеточные концентрации MG остаются низкими.

В кишечной палочке была обнаружена еще одна глиоксалаза (GloIII), идентичная шаперону Hsp31 [30, 31], экспрессия которого индуцируется тепловым шоком и осмотическим стрессом [32]. GloIII катализирует превращение MG в D-лактат без промежуточных продуктов и без участия GSH, причём со скоростью, превышающей скорость глиоксалаз I и II [30]. Этот фермент находится под контролем

глобального регулятора реакций на стресс RpoS и максимально экспрессируется в стационарной фазе [33]. Предполагается, что GloIII необходима для выживания некультивируемых форм кишечной палочки, обеспечивая дополнительный путь детоксикации MG и других электрофилов [33].

Альтернативные системы защиты от карбонильного стресса в бактериях подробно описаны в обзорной статье [34].

III. МЕТИЛГЛИОКСАЛЕВЫЙ ШУНТ

В бактериальной клетке усиление метаболического потока через гликолиз приводит к накоплению DGAP и к ответвлению потока на альтернативный путь – метилглиоксальный шунт (MG-шунт) [35]. MG-шунт составляют реакции, катализируемые MgsA и GloI/II: из DGAP при участии MgsA образуется MG, который затем превращается в D-лактат (рис. 1, реакции 13, 14 и 15). Метаболический путь контролируемого синтеза и деградации MG существует только у бактерий, включая галофильные археобактерии [24].

В клетках *E. coli* MgsA и GloI/II присутствуют конститутивно, что указывает на важность MG-шунта для выживания бактерий. Это подтверждается экспериментами со штаммом *E. coli*, лишенным *mgsA*. Потеря способности синтезировать MG и перенаправлять метаболический поток по альтернативному пути приводила к прекращению роста клеток, когда к ним добавляли ксилозу и цАМР [35].

Следует отметить, что MG-шунт не является альтернативным путем, полностью заменяющим гликолиз. Штаммы с дефектными гликолитическими ферментами были неспособны к росту на глюкозе [36]. Соотношение значений K_m для глицеральдегид-Р-дегидрогеназы (GAPD) – 0,29 мМ и MgsA – 0,5 мМ [37] или 0,7 мМ [38] показывает, что при нормальных физиологических условиях MG-шунт ингибируется, а субстрат направляется по гликолитическому пути [16, 39]. MG-шунт не сопряжен с запасанием энергии в виде АТР [40, 41] и является характерным примером энергетически неэффективного пути катаболизма глюкозы. Почему же многие бактерии используют этот неэффективный и к тому же небезопасный метаболический путь?

При определенных условиях бактерии потребляют углеводов больше, чем им требуется на поддержание базового метаболизма и роста. Это может происходить случайно, например, из-за нарушения регуляции энергетического обмена, или целенаправленно (эффект Кребтри). В любом случае, чтобы поддержать такой режим метаболизма, необходимо увеличить оборот АТР, и клетки вынуждены прибегнуть к его диссипативному гидролизу.

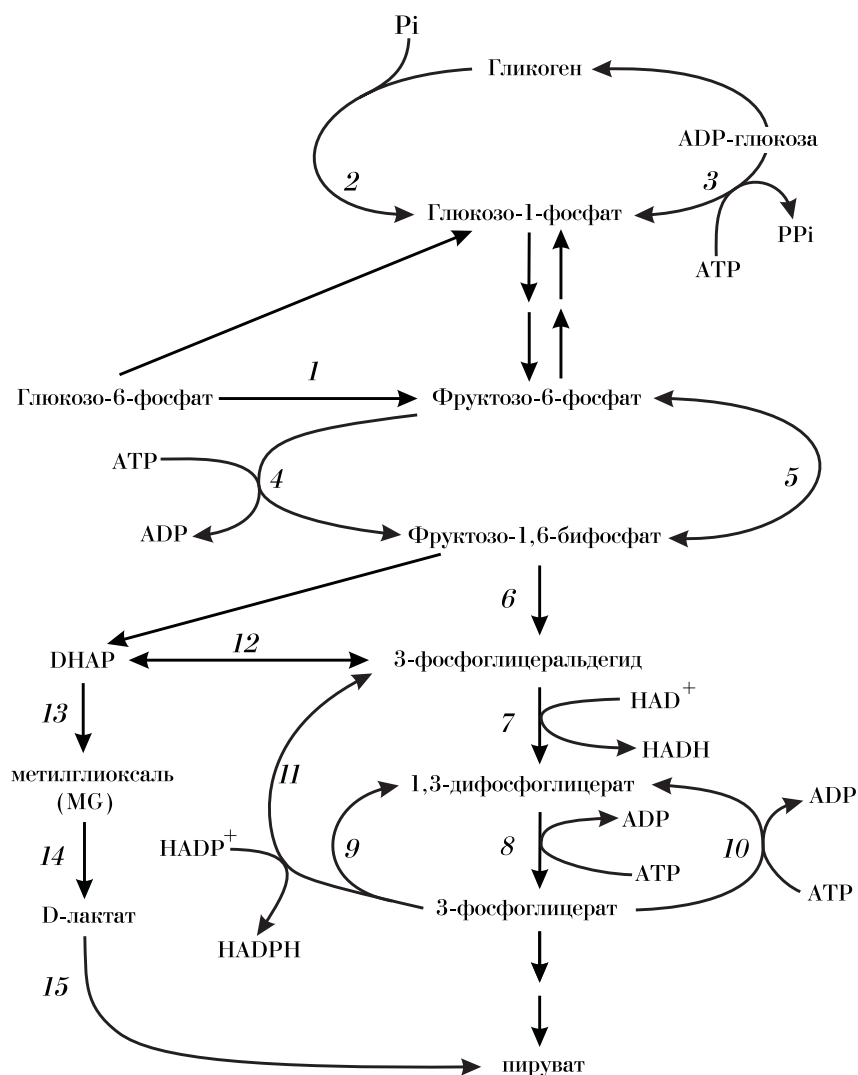


Рис. 1. Футильные циклы и шунты гликолитического пути.

Цифрами обозначены ферменты, катализирующие соответствующие реакции. 1 – глюкозофосфатизомераза, 2 – гликогенфосфорилаза, 3 – ADP-глюкозопирофосфорилаза, 4 – фосфофруктокиназа, 5 – фруктозодифосфатаза, 6 – фруктозодифосфатальдолаза, 7 – глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (GAPD), 8 – фосфоглицераткиназа, 9 – окисленная GAPD, 10 – фосфоглицераткиназа, 11 – нефосфорилирующая глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (GAPN), 12 – триозофосфатизомераза, 13 – метилглиоксальсинтаза, 14 – глиоксалаза I и II, 15 – D-лактатдегидрогеназа.

Организмы не всегда эффективно используют энергию АТФ и в некоторых случаях они её целенаправленно рассеивают. АТФ является сопрягающим энергетическим звеном анаболизма и катаболизма, поэтому, когда скорость катаболизма опережает скорость анаболизма, в клетке образуется избыток промежуточных продуктов катаболизма и АТФ. Это состояние обозначают термином «overflow metabolism» – «избыточная продукция метаболитов» [42]. Стремясь выйти из этого состояния, бактерии задействуют энергетически невыгодные метаболические пути или футильные циклы, служащие для утилизации избытка промежуточных метаболитов и/или гидролиза избыточного АТФ и обеспечивающие рассеивание избыточной энергии [42, 43]. Такие циклы и шунты гликолитического пути представлены на рис. 1. Механизмы рассеивания энергии служат инструментом стабилизации концентрации АТФ или энергетического статуса клетки, обеспечивая необходимую устойчивость метаболической системы [43, 44]. Как правило, эти диссипативные процессы представляют собой альтернативные метаболические пути или пути «скрытого» метаболизма [45, 46]. Характерным примером такого альтернативного пути в бактериях является МG-шунт. Переход на него позволяет клетке адаптировать метаболизм к дисбалансу питательных веществ и обеспечить свой рост. Однако, в случае нарушений в системах антигликирующей защиты, это может привести к развитию карбонильного стресса. Понимание причин активации МG-шунта поможет выяснить причины возникновения карбонильного стресса у бактерий.

IV. ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ МЕТИЛГЛИОКСАЛЯ

Можно выделить две независимые причины возникновения карбонильного стресса в бактериях: снижение эффективности механизмов детоксикации и избыточная продукция метаболитов. Также МG может образовываться при аэробном метаболизме треонина.

НАРУШЕНИЕ СИСТЕМ ДЕТОКСИКАЦИИ МЕТИЛГЛИОКСАЛЯ

Как уже отмечалось, основную роль в детоксикации МG играет глиоксалазная система GloI/GloII. Наиболее важным ферментом для защиты от МG является GloI. Кишечная палочка теряет жизнеспособность при наличии мутации в гене *gloA*, но не в *gloB* [47]. GloI катализирует лимитирующую стадию детоксикации МG. Дисфункция или недостаток GloI может привести к накоплению МG в летальных концентрациях.

Имеются данные, что GloI из эндотелиальных клеток человека обратимо инактивируется оксидом азота (NO), вызывающим нитрозилирование цистеиновых остатков фермента [48]. Физиологический донор NO – S-нитрозоглутатион снижает активность человеческой и дрожжевой GloI [49, 50]. Также было показано, что глутатионирование по Cys-139 ингибирует активность GloI [51]. Можно сделать вывод, что посттрансляционные модификации: нитрозилирование и глутатионирование GloI являются частью механизма регуляции метаболизма глюкозы в клетках. Для человеческой GloI было показано, что кальмодулинзависимая протеинкиназа фосфорилирует этот фермент по Tyr-106 [52], что указывает на возможное участие GloI в сигнальных каскадах. Поскольку глиоксалаза является эволюционно консервативным белком, можно ожидать, что и бактериальная GloI также может регулироваться путем посттрансляционной модификации, в том числе быть NO-зависимой.

Недостаток GloI также может служить причиной карбонильного стресса. Дефицит GloI повышает чувствительность клеток *E. coli*, выращенных в анаэробных условиях, по отношению к действию MG [53]. О важности GloI для нормального роста клеток свидетельствуют также данные о снижении выживаемости *Streptococcus mutans* и *Salmonella typhimurium*, дефицитных по *gloA*, при культивировании на средах с высоким содержанием сахара [26, 27]. Напротив, дополнительная экспрессия GloI из *Pseudomonas putida* делает клетки кишечной палочки более стрессоустойчивыми [53].

СОСТОЯНИЕ ИЗБЫТОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ МЕТАБОЛИТОВ ГЛИКОЛИЗА

Перечислим ситуации, которые могут приводить к избыточной продукции метаболитов гликолиза: 1) нарушения метаболизма триозофосфатов [9, 54–56]; 2) нарушения регуляции метаболизма углеводов, связанные с транспортом и включением в гликолиз [57–59]; 3) недостаток внутриклеточного неорганического фосфата (Pi) [37, 59, 60]; 4) рост бактерий при высоких концентрациях углевода (эффект Кребтри) [61, 62]; 5) недостаток аминного азота [16, 63]; 6) экспрессия рекомбинантных белков [7, 64, 65]; 7) рост в стационарной фазе [7, 8, 66–68].

Нарушения в метаболизме триозофосфатов

Наибольший вклад в пул эндогенного MG вносит реакция неферментативного гидролиза фосфатной группы от триозофосфатов: ДНАР и глицеральдегид-3-фосфата (G3P) [69, 70], поэтому любое нарушение их метаболизма будет влиять на образование MG. В превращении

триозофосфатов задействованы два фермента гликолиза: триозофосфатизомераза и GAPD. Нарушения в их синтезе и функционировании неизбежно приведут к избыточному образованию MG.

Дисфункция или недостаток триозофосфатизомеразы. G3P и ДНАР находятся в равновесии, регулируемом триозофосфатизомеразой. Этот фермент изомеризует ДНАР в G3P, который участвует в гликолитическом пути. В активном центре триозофосфатизомеразы происходит связывание интермедиата превращения G3P или ДНАР – эндиолатфосфата. Это соединение способно спонтанно отщеплять фосфат с образованием MG. Но и сами по себе G3P и ДНАР – нестабильные соединения и в физиологических условиях могут претерпевать спонтанную изомеризацию в эндиолатфосфат.

Вследствие ингибирования или недостатка триозофосфатизомераз в цитоплазме накапливается ДНАР [71–73]. Было показано, что отсутствие гена *tpiA* в мутантных штаммах *E. coli* приводит к накоплению MG [9, 74]. В штаммах *Mycobacterium tuberculosis*, лишенных триозофосфатизомеразы, происходило накопление триозофосфатов и снижение вирулентности [54]. Hipkiss высказал предположение, что происходящее при интенсивном гликолизе дезаминирование определенных остатков аспарагина триозофосфатизомеразы может быть причиной снижения активности этого фермента и увеличения количества MG [55]. Действительно, изменение активности триозофосфатизомеразы в *Lactococcus lactis* всего на 3% приводило к четырехкратному увеличению количества ДНАР [75].

Дисфункция или недостаток глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы. Вторым ферментом, нарушение функционирования которого может приводить к образованию MG, является GAPD. Этот фермент является редокс-чувствительным и содержит SH-группы, которые окисляются активными формами кислорода и азота до сульфиновых и сульфокислот [76], а также нитрозируются донорами NO [50, 77–81] и гликируются метилглиоксалем [82, 83]. Эти посттрансляционные модификации снижают активность GAPD, вследствие чего происходит увеличение пула триозофосфатов [56]. Активность GAPD также зависит от соотношения $NAD^+/NADH$. Поэтому истощение NAD^+ тормозит GAPD и приводит к увеличению концентрации триозофосфатов [84].

Нарушения в системе регуляции метаболизма углеводов

Нарушения в системе транспорта сахаров. Первым этапом в метаболизме углеводов является их транспорт внутрь клетки, и часто именно эта стадия лимитирует скорость утилизации источника угле-

рода. Поступление углеводов в бактериальную клетку подчиняется правилу катаболитной репрессии [85], физиологическая функция которой заключается в использовании наиболее предпочтительного углеводного субстрата и подавлении усвоения других субстратов. Принято считать, что в первую очередь такая функция сводится к недопущению перегрузки гликолитического пути метаболитами. Это реализуется за счет ограничения скорости поступления углеводов и предотвращения одновременного поступления в клетку различных углеводных субстратов. В экспериментах со штаммом *E. coli*, содержащим мультикопийную плазмиду с геном *uhpT*, кодирующим транспортную систему сахарофосфатов, было выявлено накопление токсичных концентраций МГ [57]. Наоборот, мутанты *Prevotella ruminicola*, характеризующиеся пониженным содержанием переносчиков глюкозы в мембране, производили МГ в более низких концентрациях [63].

Известно, что катаболитная репрессия связана с содержанием в клетках цАМР. Основная функция цАМР в бактериях заключается в регуляции транскрипции индуцибельных генов, ответственных за транспорт и катаболизм углеводов [86]. Поэтому любые изменения в концентрации цАМР или в сигнальных путях этого бирегулятора могут быть причиной неконтролируемого транспорта углеводов и привести к перегрузке начальных стадий гликолиза метаболитами и образованию МГ. Это получило экспериментальное подтверждение. Накопление МГ в токсичных концентрациях происходило в клетках культуры *E. coli*, растущей на среде с цАМР и различными сахарами в качестве источников углерода [87, 88]. Между наличием цАМР и наличием MgsA для энтеробактерий была установлена положительная корреляция. Это, по-видимому, позволяет одновременно катаболизировать различные углеводы, направляя избыток ДНАР по МГ-пути, что снижает вероятность неферментативного образования МГ из триозофосфатов [87]. Энтеробактерии способны одновременно с гликолизом задействовать еще один путь катаболизма углеводов – путь Энтнера-Дудорова, что дает им возможность утилизировать и глюкозу и сахарокислоты [89].

К состоянию избыточной продукции метаболитов могут приводить не только количественные изменения цАМР, но и нарушения в путях регуляции этого мессенджера. Так, например, рост штамма *E. coli*, синтезирующего мутантный белок-рецептор цАМР, при культивировании в минимальной среде с глюкозо-6-фосфатом ингибировался из-за образования МГ [90]. Было установлено, что нарушение сигнальных функций цАМР приводит к повышенному

уровню фосфофруктокиназы – регуляторного фермента, определяющего скорость гликолиза, и, как следствие, к избыточному накоплению триозофосфатов [90].

Рост на средах с глицерином. Глицерин является хорошим источником углерода и энергии для многих прокариотических организмов. Метаболизм глицерина, как и углеводов, начинается с транспорта внутрь клетки, затем глицерин вводится в гликолиз на уровне ДНАР. Есть два пути образования ДНАР из глицерина. В первом АТР-зависимая глицеринкиназа фосфорилирует глицерин до глицерин-3-фосфата, который затем окисляется до ДНАР под действием FAD/FMN-зависимой (анаэробной) или NAD-зависимой (аэробной) глицерол-3-фосфат-дегидрогеназы. Во втором глицерин окисляется до дигидроксиацетона глицериндегидрогеназой и фосфорилируется до ДНАР АТР- или фосфоенолпируват-зависимой дигидроксиацетонкиназой. Нарушение метаболизма глицерина, как показано для некоторых прокариот, сопровождается эндогенным накоплением MG [38, 91, 92]. Например, штамм *E. coli*, утративший в результате мутаций контроль над метаболизмом глицерина, накапливал MG в токсичных концентрациях [38]. Анаэробная ферментация глицерина трансгенной кишечной палочкой также сопровождалась накоплением MG [53]. Высокий уровень экспрессии глицеринкиназы в *Bacillus stearothermophilus* способствует неконтролируемому накоплению глицерин-3-фосфата, что сопровождается истощением пула Pi и активацией MgsA [37, 91]. Cooper и Anderson отмечали накопление MG в высоких концентрациях при образовании гликогена из глицерина в *E. coli*, лишённых гена триозофосфатизомеразы [9]. В анаэробных условиях глицерин в концентрации 5 г/л и выше ингибировал образование 1,3-пропандиола и рост *E. coli* [53]. Для цианобактерий *Synechococcus sp.* PCC 7002, способных эффективно метаболизировать глицерин, удаление гена *mgsA* приводило к образованию MG [93]. Добавление глицерина к клеткам *Synechococcus*, дефицитных по гену *sakR1*, кодирующему альдегидо- и кеторедуктазу, вызывало резкое увеличение концентрации эндогенного MG [93].

Недостаток неорганического фосфата. Фосфор играет важную роль в энергетическом обмене, а также в интеграции метаболизма углеводов, жиров и белков. Неорганический фосфат является субстратом фосфотрансферазной системы, фосфофруктокиназы и GAPD. В факультативно анаэробных бактериях между ферментами гликолиза и АТР-азой существует конкуренция за внутриклеточный Pi. Увеличение доступности углеводов в среде культивирования зачастую приводит к истощению внутриклеточных запасов Pi из-за

расходования на фосфорилирование углеводов при увеличении их поступления в клетку. Известно, что низкие концентрации Pi лимитируют активность GAPD и, наоборот, стимулируют активность MgsA [37]. В результате происходит накопление ДНАР и перенаправление метаболического потока через метилглиоксальный шунт, высвобождающий Pi в метилглиоксальсинтазной реакции (рис. 1). Норрег и Соорег считают, что одна из физиологических задач MG-пути заключается в увеличении оборота неорганического фосфата при росте на средах с низким содержанием фосфатов [37]. Это было экспериментально доказано с использованием штаммов *E. coli* с делецией гена *mgsA*. В физиологических условиях рост клеток ингибировался при избытке сахарофосфатов и восстанавливался при добавлении Pi [59].

Имеются данные, указывающие на подавление окислительного фосфорилирования недостатком Pi, что объясняется конкуренцией между GAPD и АТР-азой за Pi [94]. Ингибирование окислительного фосфорилирования способствует гиперактивации гликолитического потока (эффект Кребтри) [84, 94] и связанного с этим увеличению образования MG.

При нарушении функционирования GAPD, а также дефиците Pi и/или ADP в цитоплазме возможно перенаправление субстрата по другим шунтирующим путям, позволяющим катаболизировать триозофосфаты (альтернативным MG-шунту). У некоторых грамположительных бактерий родов *Bacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* и архебактериях обнаружена NADP-зависимая нефосфорилирующая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDN) (EC 1.2.1.9), катализирующая необратимое гидролитическое окисление 3-фосфоглицеральдегида до 3-фосфоглицерата, минуя образование АТР в фосфоглицераткиназной реакции (рис. 1, реакция 11) [95, 96]. Еще один путь, шунтирующий гликолиз, обеспечивает окисленная GAPD (рис. 1, реакция 9). Мягкое окисление цистеиновых остатков до сульфеновой кислоты в активном центре этого фермента приводит к снижению дегидрогеназной и появлению ацилфосфатазной активности [97]. Эта посттрансляционная модификация GAPD приводит к разобщению окисления и фосфорилирования в гликолизе и снижению выхода АТР [98]. Реакция нефосфоролитического окисления 1,3-дифосфоглицерата и обратная ей фосфоглицераткиназная реакция образуют футильный цикл гликолиза (рис. 1, реакции 9 и 10). Во всех случаях направление потока субстрата по энергетически невыгодным шунтирующим путям и футильным циклам позволяет быстрее получить пируват, стабилизировать энергетический статус клетки, а также

обеспечить приток субстратов для биосинтетических реакций [98].

Все эти факты указывают на непосредственную регулируемую роль внутриклеточного пула P_i в энергетическом метаболизме и опосредованную в развитии карбонильного стресса у бактерий.

Высокая концентрация углеводов (эффект Кребтри). Как было отмечено, между интенсивностью гликолитического потока и количеством образующегося МГ существует прямая зависимость. Увеличение скорости гликолиза может происходить в результате эффекта Кребтри (эффекта глюкозы), который заключается в подавлении дыхания при высоких концентрациях глюкозы [99]. В аэробных условиях некоторые бактерии большую часть глюкозы катаболизируют до побочных продуктов (лактат, ацетат, этанол и др.), т.е. проявляют бактериальный эффект Кребтри [100, 101]. Хотя механизм этого явления до сих пор не ясен, причина такого на первый взгляд абсурдного поведения кроется в стремлении получить адаптационное преимущество, которое напрямую зависит от количества и генетического разнообразия клеток в популяции [102]. Эффект Кребтри описан также у дрожжей и быстропролиферирующих клеток млекопитающих [103].

Для максимизации скорости роста при высокой доступности субстрата клетки предпочитают неэффективный катаболизм (гликолиз) эффективному катаболизму (окислительное фосфорилирование) (рис. 2). Рост микробной популяции в изменяющихся условиях – компромисс между двумя метаболическими стратегиями: скоростью и эффективностью утилизации субстрата [104]. Так, в силу различных ограничений, АТР может образовываться с высокой скоростью и низким выходом, либо с высоким выходом и низкой скоростью [104–107]. Соотношение скоростей образования и гидролиза АТР (оборот АТР) определяет скорость метаболического потока. Когда скорость гидролиза АТР меньше скорости его образования, для поддержания высокой скорости гликолиза в метаболизм включаются энергетически невыгодные пути и футильные циклы (рис. 1). Перераспределение метаболических потоков по этим альтернативным путям позволяет не только стабилизировать энергетический статус клетки, но и ускорить окисление субстрата. Как правило, альтернативные пути включаются в метаболизм в условиях недостатка аминного азота и/или P_i , что эквивалентно высоким концентрациям глюкозы. Естественно, что в таких условиях активизируется и МГ-шунт (рис. 1, реакции 13–15). Хотя стратегия «скорости» дает определенные адаптационные преимущества, она таит в себе и угрозу, поскольку нарушения в системах, образующих и утилизирующих МГ, могут привести к

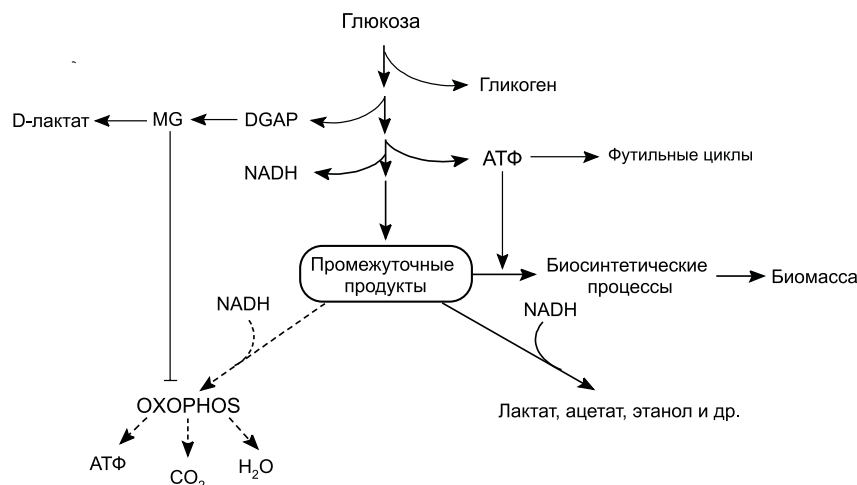


Рис. 2. Альтернативные метаболические стратегии бактерий.

При низких концентрациях субстрата энергосберегающий катаболизм (окислительное фосфорилирование – OXPHOS) и при высоких – быстрый, но не эффективный гликолиз.

накоплению этого α -кетоальдегида в дозах, несовместимых с жизнью. Другими словами, стратегия «скорости» – это стратегия высокого риска. Однако бактерии готовы рисковать жизнью ради победы в конкурентной борьбе за пищевые ресурсы.

В норме скорость поглощения глюкозы клетками строго регулируется концентрациями азотсодержащих субстратов и P_i . Таким образом, клетка с помощью глобальных регуляторов интегрирует информацию о концентрациях глюкозы, источника азота и P_i и подстраивает свой метаболизм под существующие условия, стабилизируя энергетический статус [108]. Нарушения в функционировании регуляторных систем приводят к нарушению соотношения между получением энергии и процессами биосинтеза (рис. 3). В некоторых случаях рассогласование в энергетическом обмене возникает из-за резкого изменения условий роста. Наиболее изученный случай – это резкий переход от условий голода к изобилию, индуцирующий краткосрочный эффект Кребтри.

При резком переходе с одного режима питания на другой клетка вступает в переходный период, связанный с перестройкой метаболизма. Адаптационный ответ катаболических систем на повышение концентрации глюкозы опережает адаптацию анаболических систем, что, прежде всего, связано с индукцией экспрессии генов и необходи-

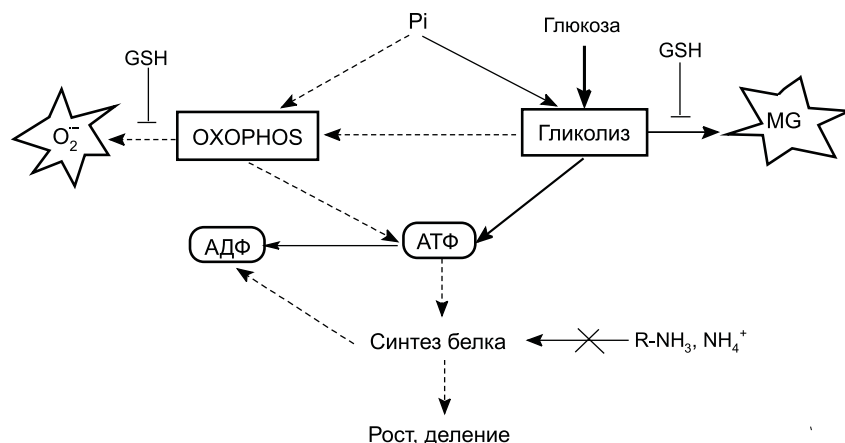


Рис. 3. Скорость оборота АТФ – интегративный показатель, отражающий соотношение концентраций основных питательных компонентов. Он определяет интенсивность метаболического потока, влияющего на скорость образования АФК и АКС.

мостью создания компонентов системы биосинтеза белка. В результате такого дисбаланса включаются пути, понижающие энергетический статус клетки. Так, с помощью метода FBA было предсказано, что в процессе адаптации к условиям избытка клетки *E. coli* в первую очередь используют футильные циклы, метилглиоксальный и глиоксилатный шунты [62], а также задействуют цитохром bd-II оксидазы с низким выходом электрогенного переноса протонов ($H^+/e^- = 1$) [109].

Еще одним объяснением краткосрочного эффекта Кребтри служит то, что транспортные системы сахаров сохраняют активность даже при длительном голоде, что позволяет им мгновенно поглощать сахар при внезапном его появлении в среде.

Для краткосрочного эффекта Кребтри также характерна избыточная продукция метаболитов. Типичный пример этого – накопление триозофосфатов, возникающее из-за несоответствия скоростей реакций между различными участками метаболического пути. Переполнение клеток ДНАР часто происходит из-за сильного увеличения потока субстрата на стадии превращения фруктозо-дифосфата в G3P и ДНАР в альдолазной реакции с одновременным уменьшением интенсивности последующих реакций гликолиза от G3P до фосфоенолпирувата. Впервые эффект накопления сахарофосфатов, фруктозо-дифосфата и ДНАР наблюдался при добавлении глюкозы к культуре *E. coli*, растущей на питательной среде с ацетатом [110]. Исследования, основанные на импульсной подаче глюкозы к

хемостатной культуре *E. coli*, лимитированной по глюкозе, выявили, что увеличение внутриклеточной концентрации фруктозо-дифосфата и ДНАР происходит уже в течение первых секунд после изменения состава питательной среды [62, 111, 112]. В этих условиях мутантные штаммы *E. coli*, содержавшие цитохромоксидазу bd-II в качестве единственного переносчика электронов на кислород, использовали пируват-оксидазный путь и MG-шунт, уступающие по выходу АТР пируватдегидрогеназному и лактатдегидрогеназному путям [109]. Такие мутантные клетки накапливали MG в концентрациях, в 3 раза превышающих его содержание у клеток дикого типа.

В естественных условиях краткосрочный эффект Кребтра испытывают стрептококки – нормальные обитатели ротовой полости человека при резкой смене пищевого рациона. Внезапное увеличение концентрации сахара индуцирует быстрое его усвоение и переработку через гликолиз в органическую кислоту, которая является одним из факторов конкурентоспособности и вирулентности этих бактерий [26].

Недостаток аминного азота. Известно, что метаболизм углерода регулируется доступностью N-содержащего субстрата. Впервые на роль источника азота в регуляции синтеза MG обратил внимание Russell при непрерывном культивировании *P. ruminicola* – обитателя рубца крупного рогатого скота. В условиях избытка глюкозы и лимита источника азота (3,6 мМ аммиака и 50 мМ глюкозы) происходило уменьшение количества жизнеспособных клеток на три порядка [113], а также секреция MG в культуральную среду (от 3 до 4 мМ) [63]. В этих условиях клетки *P. ruminicola* содержали полисахаридные гранулы, очень высокие концентрации АТР и не могли поддерживать мембранный потенциал [63], причем 10-кратное увеличение [Pi] в среде оказало лишь незначительный эффект на образование MG. Сопоставив результаты, авторы статьи пришли к выводу, что, когда АТР не расходуется на биосинтез белка из-за недостатка азотсодержащего субстрата, активируется нефосфорилирующий путь катаболизма глюкозы – MG-шунт [63] (рис. 3). Аналогичные эффекты показаны и для *E. coli*, выращенной на среде с избытком глюкозы и лимитом аммиака [16, 114].

Экспрессия рекомбинатного белка. Еще одним фактором, способствующим переходу к состоянию избыточной продукции метаболитов, является экспрессия рекомбинантного белка [115]. Рекомбинантные белки из-за высокой концентрации и большей стабильности могут быть цитоплазматическими аккумуляторами стабильных гликированных аддуктов. Неслучайно первым выделенным неферментативно гликированным бактериальным белком был γ -интерферон человека, экспрессированный в *E. coli* [66, 67]. Нами было показано

гликирование соевого левоглобина (симбиотического гемоглобина бобовых), также экспрессированного в *E. coli* [64, 65]. Отметим, что первая экспрессия левоглобина была проведена нами совместно с Институтом биоорганической химии Польской АН [116].

Для увеличения продуктивности штаммов *E. coli* необходимо использовать режимы культивирования, не допускающие переход на низкоэффективный гликолиз, сопряженный с опасностью развития карбонильного стресса и снижения внутриклеточного рН [117]. Однако стабильность систем эффективного метаболизма может быть нарушена даже при низкой концентрации углеводного субстрата из-за появления быстрорастущих мутантов с неэффективным метаболизмом, как это было показано с помощью метода FBA для модельной бактериальной клетки, учитывающей синтез рекомбинантного белка [102].

Рост в стационарной фазе. Рассмотренные выше случаи активации MG-шунта относятся к условиям несбалансированного роста, который имеет место в неконтролируемых условиях окружающей среды и в стационарной фазе при культивировании в лабораторных условиях. Эта фаза характеризуется истощением питательной среды и накоплением токсичных продуктов метаболизма, а также развитием окислительного стресса. Избыточное образование активных форм кислорода может быть еще одним механизмом развития карбонильного стресса в прокариотической клетке. Метилглиоксаль обладает способностью генерировать свободно-радикальные продукты, в том числе и O_2^- в реакции с аминокислотами и гуанидиновыми основаниями [10–14, 118, 119]. Свободнорадикальные продукты могут повреждать белки и нуклеиновые кислоты, а также инициировать цепные реакции перекисного окисления липидов. При этом может происходить автокаталитическое усиление продукции АКС и активных форм кислорода.

В стационарной фазе преобладают клетки с пониженной метаболической активностью, т.е. в покое состоянии, которое характеризуется отсутствием деления и низкой скоростью обмена белка. Именно при таком инертном состоянии возможен длительный контакт биополимеров с АКС и накопление гликированных аддуктов внутри клеток. В активно делящихся клетках экспоненциальной фазы концентрация AGEs, возникших в результате кратковременного карбонильного стресса, может «разбавляться» в последующих поколениях. Неделяющиеся клетки являются своего рода аккумуляторами повреждений, вызванных гликированием, что объясняет наблюдаемое увеличение уровня неферментативно гликированных белков и нуклеиновых кислот в стационарной бактериальной культуре по сравнению с экспоненциальной [7, 8, 66, 67, 120].

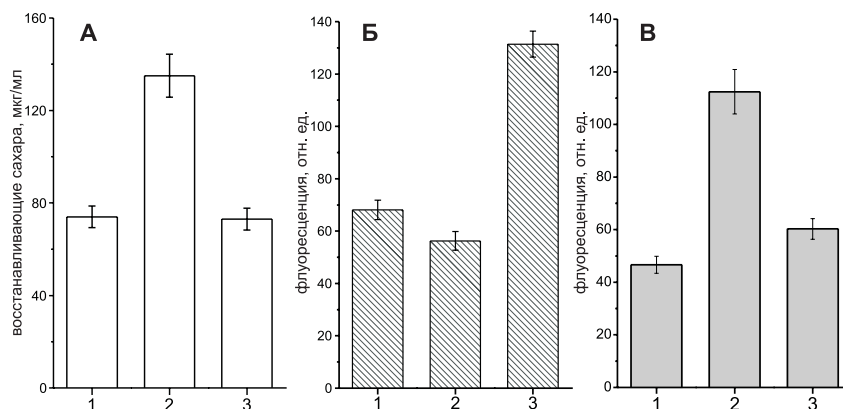


Рис. 4. Внутриклеточная концентрация восстанавливающих сахаров, гликогена и флуоресцирующих AGEs в культуре *E. coli* TB-1, экспрессирующей Lb, выращенной в различных условиях на среде LB: 1 – $K_3 = 0,14$ (7 ч роста), 2 – $K_3 = 0,14$ (72 ч роста), 3 – $K_3 = 0,71$ (72 ч роста), K_3 – коэффициент заполнения колбы Эрленмейера питательной средой.

A – содержание восстанавливающих сахаров в клеточном экстракте.

B – содержание гликогена в относительных единицах флуоресценции нильского красного, адсорбированного полимером ($\lambda_{\text{возб}} = 550$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 615$ нм).

C – содержание связанных с белками AGEs в единицах интенсивности автофлуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 320$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 395$ нм).

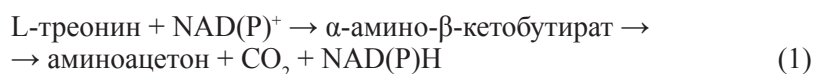
Несколько иначе обстоят дела в начале стационарной фазы. При избытке углеводного субстрата и недостатке N-содержащих соединений, т.е. в условиях ограничения роста, бактерии могут синтезировать гликоген. Синтез гликогена и MG-шунт находятся между собой в антагонизме. Направление потока углеводов по пути синтеза резервного полимера может уменьшить нагрузку на гликолитический и метилглиоксальный пути, а также способствовать стабилизации энергетического статуса клетки (рис. 1). Существует зависимость между внутриклеточным содержанием сахарофосфатов, количеством гликогена и уровнем неферментативно гликированных белков [65]. В условиях, благоприятствующих синтезу гликогена в клетках *E. coli* стационарной фазы, уровень неферментативно гликированных белков такой же, как и у клеток экспоненциальной фазы, в отличие от клеток стационарной фазы, не накапливающих гликоген (рис. 4).

Пути возникновения карбонильного стресса в стационарных культурах не связаны с неконтролируемым поглощением углеводов. Кроме того, в этих условиях неферментативное образование MG, вероятно, превалирует над ферментативным.

КАТАБОЛИЗМ ТРЕОНИНА

Источником активных карбонильных соединений могут быть α -аминокетоны (аминоацетон и 5-аминолевулиновая кислота), при аэробном окислении которых образуются α -кетоальдегиды [121]. Известно, что в присутствии кислорода ферментативное [122–124] и неферментативное [125] окисление аминокетона приводят к образованию MG. Аминоацетон – промежуточный продукт катаболизма треонина и аланина, в определенных условиях может накапливаться в бактериях. Образование аминокетона из треонина было показано у ряда микроорганизмов: *E. coli* [59, 126, 127], *Staphylococcus aureus* [128], *Streptococcus faecalis*, *Corynebacterium erythrogenes* [129], *Rhodopseudomonas spheroides* [130], *Pseudomonas* spp. [131], *Arthrobacter globiformis* [132], *B. subtilis* [133, 134], а также археобактерии *Pyrococcus furiosus* [135].

В клетках *E. coli* описано несколько путей катаболизма треонина. Преобладающий путь – окисление гидроксильной группы NAD(P)⁺-дегидрогеназой (ЕС 1.1.1.103) до α -амино- β -кетобутирата, который может декарбоксилироваться спонтанно или при участии декарбоксилазы с образованием аминокетона и CO₂ (реакция 1), либо расщепляться при участии КоА и КоА-лиазы (ЕС 2.3.1.29) на глицин и ацетил-КоА (реакция 2) [127, 128, 136–139]:



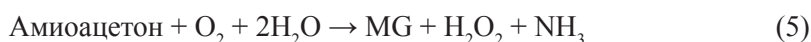
Эти реакции свойственны не только микроорганизмам, но и животным, и являются основными биохимическими путями аэробного катаболизма треонина. Будет ли треонин преобразован в аминокетон, зависит от количества КоА и O₂ в клетке [139].

Кроме того, декарбоксилирование треонина может происходить с образованием 1-амино-2-пропанола, который затем окисляется до аминокетона (реакции 3, 4) [134]:



Образовавшийся аминокетон либо восстанавливается до 1-амино-2-пропанола аминокетонредуктазой, либо дезаминируется при участии аминоксидазы с образованием MG (реакция 5) [134]. В *S. aureus* было показано образование MG из аминокетона в цикле окисления глицина или треонина под действием неспецифических аминоксидаз [128]. О подобном механизме образования MG сооб-

щилось и для *Pseudomonas* [140]. Для *Arthrobacter* установлена способность метаболизировать до MG около 70% аминокетона, присутствующего в среде культивирования [132]. В клетках *E. coli* также было показано образование MG при катаболизме треонина [59].



Накопление аминокетона может быть и следствием активации биосинтетических процессов. Показано образование в *E. coli* аминокетона при биосинтезе треонина в глиоксалатном шунте [141, 142]. Имеются данные о том, что синтез 5-аминолевулиновой кислоты – предшественника тетрапирролов в *E. coli* и *Rhodobacter sphaeroides*, модифицированных геном *hemA*, сопровождается образованием аминокетона в количестве 0,2–0,5 г/л [143, 144]. Возможно образование аминокетона при спонтанном декарбоксилировании аминокетоксусной кислоты, образующейся при конденсации глицина с ацетил-КоА.

Не только MG, но и сам аминокетон обладает токсичными свойствами и способен ингибировать рост кишечной палочки [144]. Имеются доказательства повреждающего действия аминокетона на ДНК [145].

Известно, что в *E. coli* при отсутствии глюкозы и кислорода активируется треонин-дезаминаза (треонин-дегидратаза), катализирующая превращение треонина в α -кетобутират. Амиокетон и α -кетобутират составляют пул кетонных тел, избыточное накопление которых в бактериях в результате интенсивной утилизации аминокислот также может привести к развитию карбонильного стресса.

Помимо ферментативного пути окисления, катализировать окисление аминокетона до MG могут ионы Fe^{3+} как свободные, так и в составе цитохрома с [146]. Эта реакция сопровождается образованием перекиси водорода, супероксидного радикала и свободного радикала аминокетона, усиливающих повреждающее действие метилглиоксаля на биомолекулы.

V. РЕГУЛЯТОРНЫЕ И СИГНАЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ МЕТИЛГЛИОКСАЛЯ

Некоторые промежуточные метаболиты гликолиза (глюкозо-6-фосфат, фруктозо-бифосфат, фосфоенолпируват) могут регулировать интенсивность гликолиза и связанных с ним метаболических путей. Нельзя исключить и регуляторную функцию MG. Практически вся информация о сигнальных функциях MG относится к растениям и дрожжам. Впервые Szent-Gyorgyi в 1960-х годах, пытаясь обнаружить

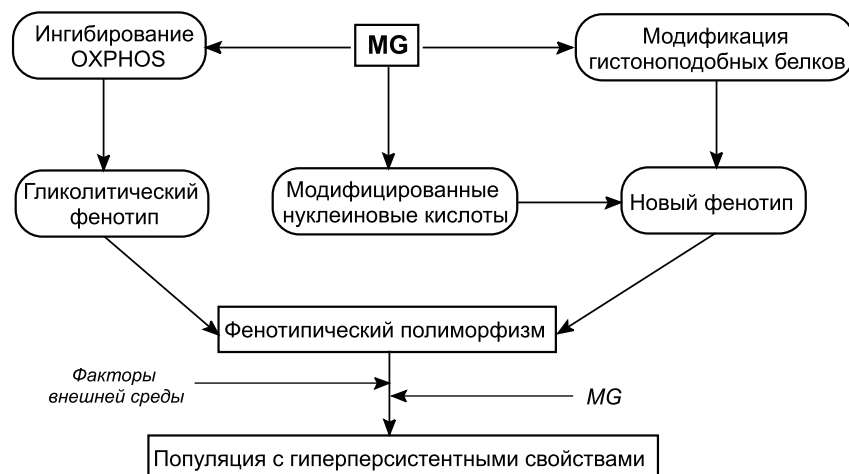


Рис. 5. Роль метилглиоксала в формировании фенотипического разнообразия и гиперперсистентного потенциала бактериальной популяции.

у кетоальдегидов физиологические функции, указал на возможное участие MG в регуляции роста и деления клеток [147–149]. Экспериментальных данных, подтверждающих наличие сигнальных функций MG в бактериях, к настоящему времени нет, поэтому наши размышления на эту тему носят гипотетический характер.

Если попытаться отойти от точки зрения на MG как на бактериальный токсин, то можно отметить несколько потенциальных физиологических функций этой молекулы. Он может оказывать как аутокринное, так и паракринное действие, соответственно функционируя внутри клетки или вне ее. MG может быть одним из промежуточных метаболитов гликолиза, ответственным за реализацию эффекта Кребтра и формирование гликолитического фенотипа (рис. 5). Ингибирующее действие на работу дыхательных цепей MG оказывает, задействуя Ca^{2+} -сигнализацию. Добавление MG к клеткам *E. coli* приводило к активации La^{3+} -чувствительных Ca^{2+} -каналов и быстрому увеличению в цитозоле свободного Ca^{2+} , ингибирующего F_1F_0 -АТФ-азу [150]. Аналогичным действием, но с меньшей эффективностью, обладают глюкоза и фруктозодифосфат [103, 150, 151]. Таким образом, влияя на внутриклеточную концентрацию свободного Ca^{2+} , MG может косвенно влиять на различные физиологические процессы (хемотаксис, спорообразование, клеточный цикл, синтез специфических белков, вирулентность) [152].

Для *S. mutans* было показано, что внутриклеточный MG может быть регулятором гликолиза в кислой среде, поскольку у мутантов, дефицитных по GloI, при pH 5,0 скорость гликолиза превышала таковую у клеток дикого типа [26]. Связан ли этот эффект с увеличением концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле под влиянием MG, еще предстоит выяснить.

Метилглиоксаль, подобно $\text{O}_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 , может участвовать в клеточной сигнализации. Взаимодействуя с остатками цистеина и/или лизина факторов транскрипции и гистоноподобных белков, MG может изменять транскрипционный и репликативный потенциал нуклеоида. Таким образом, разнонаправлено воздействуя на геном бактериальной клетки, MG выступает в роли мутагена и эпигенетического модулятора, что создает предпосылки для формирования новых фенотипов (рис. 5). Увеличение фенотипического полиморфизма в результате эффекта Кребтри, эпигенетических воздействий и мутагенеза повышает адаптационный потенциал популяции к факторам окружающей среды [153]. Это особенно важно для патогенных и условно-патогенных бактерий, перед которыми стоит задача колонизировать клетки организма-хозяина. Образующийся в клетках MG может быть звеном молекулярного механизма, увеличивающего степень персистенции бактериальной популяции, и есть данные, подтверждающие это предположение. Увеличение внутриклеточной концентрации MG у мутантов *E. coli*, лишенных GAPD и транскетолазы, способствовало увеличению персистентных свойств [154]. Следовательно, бактерии могут специально изменять метаболические потоки в сторону синтеза MG, который действует как мутаген. Сформировавшиеся мутанты представляют собой материал, подвергающийся естественному отбору, например, на резистентность к антибиотикам. Тем самым, бактерии используют стратегию контролируемого мутагенеза для формирования популяций, приспособленных различным условиям, т.е. с гиперперсистентным потенциалом. Увеличение степени персистенции важно для развития лекарственной устойчивости патогенных бактерий, и, как следствие, определяет исход хронического инфекционного процесса.

В литературе обсуждается способность экспортируемого бактериального MG выступать в качестве фактора вирулентности, оказывая токсическое действие на соседние клетки организма-хозяина. Проведенные эксперименты выявили способность внеклеточного MG вызывать апоптоз макрофагов в очагах инфекции *M. bovis* [155]. Секретируемый периодонтальными патогенами *Bacteroides forsythus* MG также может быть метаболическим фактором, способствующим заражению хозяина [68].

Также, по аналогии с дрожжевыми клетками, MG может влиять на транскрипцию, взаимодействуя с остатками цистеинов транскрипционных факторов, что изменяет их сродство к ДНК. В концентрациях, ингибирующих рост, MG связывается с SH-группами фактора транскрипции NemR, что снижает его связывание с промотором *nemRA* и приводит к транскрипции *gloA* [157–159].

Выполнять регуляторную функцию в клетке может не только MG, но и промежуточный продукт глиоксалазной реакции – S-D-лактоилглутатион, являющийся активатором калиевых каналов KefGB и KefFC, которые транспортируют K^+ из клетки в обмен на ионы Na^+ и H^+ , приводя к закислению цитоплазмы [160]. Каналы Kef ингибируются GSH и, напротив, активируются S-D-лактоилглутатионом [161–164]. Высказана идея, что от внутриклеточного пула последнего зависит выживание бактериальных клеток, испытывающих карбонильный стресс, поскольку активация системы Kef может компенсировать нарушения в ферментной системе детоксикации активных альдегидов [47, 165]. Быстрое превращение S-D-лактоилглутатион в D-лактат в результате сверхэкспрессии GloII повышает чувствительность *E. coli* к MG [165]. Возможно существование и других мишеней для этого вещества в клетке.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Карбонильный стресс тесно связан с высокими концентрациями глюкозы в среде обитания бактерий. Сама по себе глюкоза не является токсичным веществом и для многих микроорганизмов является наиболее предпочтительным источником углерода. Бактерии имеют сложную систему регуляции поступления этого субстрата внутрь клетки, согласованную с доступностью источников азота и фосфора. Поэтому при нормальном функционировании регуляторных систем и систем детоксикации MG, карбонильный стресс должен быть маловероятным явлением в жизни бактерий. Почему же карбонильный стресс все же возникает? Основная причина заключается в спонтанных или индуцированных действием активных форм кислорода мутациях, которым легко подвержены прокариоты. Если мутации затрагивают ферменты гликолиза и глиоксалазной системы, то становится возможным образование MG в цитотоксических концентрациях, причем мутации могут носить как негативный, так и позитивный характер. Еще Freedberg в 1971 году заметил в культуре клеток *E. coli* наличие устойчивой субпопуляции, способной расти в присутствии 1 mM MG как единственного источника углерода [38]. У этих

мутантных штаммов активность глиоксалазной системы в 4–8 раз превосходила таковую у клеток дикого типа. Аналогичные мутанты *E. coli* с повышенной активностью GloI были получены и в работе [166].

С высокими концентрациями сахаров бактерии, как правило, сталкиваются в условиях лабораторного культивирования. В природе существует сильная конкуренция за ограниченные питательные ресурсы, и большинство бактерий живут в условиях голода. Поэтому разобщение анаболических и катаболических процессов происходит только при резком переходе от условий голода к изобилию, но не наоборот [62], хотя и в первом и во втором случаях происходит мгновенное увеличение цАМФ [62], что может привести к неконтролируемому транспорту глюкозы и других углеводсодержащих субстратов внутрь клетки. В естественных условиях с высокими концентрациями углеводов обычно сталкиваются бактерии – обитатели ротовой полости и пищеварительного тракта животных. Резкие колебания в концентрации углеводного субстрата могут вызывать нарушение регуляции метаболических путей и синтеза MG. Метилглиоксаль бактериального происхождения был обнаружен в толстом кишечнике [167], в жидкости десневой борозды [168], в инфекционной гранулеме, вызванной микобактериями туберкулеза [156]. Действие бактериального MG на эукариотические клетки хозяина пока плохо изучено. Обсуждается гипотеза, что образование MG в больших количествах в метилглиоксальсинтазной реакции может быть механизмом, повышающим вирулентность патогенных бактерий [169]. Интересные результаты были получены в области гастроэнтерологии. Campbell с соавторами предложили гипотезу «метаболических бактериальных токсинов» [170], согласно которой выделяемые кишечной микрофлорой в результате анаэробного сбраживания углеводов токсичные метаболиты (спирты, диолы, кетоны, кислоты и альдегиды) влияют на баланс кишечной микрофлоры, и, через кровотока, на различные клетки (нейроны, миоциты, клетки иммунной системы). Основная роль в реализации токсичного действия принадлежит MG, расчетный уровень которого в плазме крови за счет деятельности энтеробактерий может увеличиваться от микромолярных до миллимолярных концентраций [170]. Действие MG на эукариотические клетки объясняется нарушением механизмов ионной сигнализации, включая и Ca²⁺-зависимую сигнализацию [150]. Такие гастроэнтерологические проблемы, как синдром раздраженного кишечника и непереносимость лактозы, могут быть вызваны действием метилглиоксала и других бактериальных токсинов. Можно надеяться, что знание биохимических механизмов развития карбонильного стресса у бактерий поможет в выработке мер профи-

лактики и терапии гастроэнтерологических расстройств и внутрибрюшинных инфекций.

Карбонильный стресс в бактериях может возникнуть и при искусственном вмешательстве в геном производственных штаммов бактерий для получения высокоэффективных продуцентов 1,3-пропандиола, 1,2-пропандиола и дигидроксиацетона [171, 172], широко используемых в различных отраслях промышленности.

В заключение хотелось бы отметить, что понимание биохимических механизмов карбонильного стресса в бактериях важно не только с точки зрения «нового» знания, интересного для эволюционной биологии, но и может быть полезно для выработки мер профилактики гастроэнтерологических расстройств, создания пробиотиков, а также в реализации практических задач, связанных с метаболической инженерией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baynes, J.W. (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, **40**, 405–412.
2. Rabbani, N., Thornalley, P.J. (2012) Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids*, **42**, 1087–1096.
3. Maillard, L.C. (1912) Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines per voie methodique, *C. R. Acad. Sci.* **154**, 66–68.
4. Hodge, J.E., Rist, C.E. (1952) *N*-Glycosyl derivatives of secondary amines. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 1494–1497.
5. Rahbar, S. (1968) An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chim. Acta*, **22**, 296–298.
6. Thornalley, P. (2005) Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1043**, 111–117.
7. Mironova, R., Niwa, T., Hayashi, H., Dimitrova, R., Ivanov, I. (2001) Evidence for nonenzymatic glycosylation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **39**, 1061–1068.
8. Pepper, E. (2007) Mechanisms of long-term survival in *Escherichia coli*: PhD Thesis. (Molecular biology), Univ. of Southern California, USA, 138 Pages.
9. Cooper, R.A., Anderson, A. (1970) The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **11**, 273–276.
10. Yim, H.S., Kang, S.O., Hah, Y.C., Chock, P.B., Yim, M.B. (1995) Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. *J. Biol. Chem.*, **270**, 28228–28233.
11. Nohara, Y., Usui, T., Kinoshita, T., Watanabe, M. (2002) Generation of superoxide anions during the reaction of guanidino compounds with methylglyoxal. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **50**, 179–184.
12. Desai, K.M., Wu, L. (2008) Free radical generation by methylglyoxal in tissues. *Drug Metabol. Drug Interact.*, **23**, 151–173.
13. Kalapos, M.P. (2008) The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem. Biol. Interact.*, **171**, 251–271.
14. Шумаев, К.Б., Губкина, С.А., Кумскова, Е.М., Шепелькова, Г.С., Рууге, Э.К., Ланкин, В.З. (2009) Механизм образования супероксидного радикала при взаимодей-

- ствии L-лизина с дикарбонильными соединениями. *Биохимия*, **74**, 568–574.
15. Fravel, H.N.A., McBrien, B.C.H. (1980) The effect of methylglyoxal on cell division and the synthesis of protein and DNA in synchronous and asynchronous cultures of *Escherichia coli* B/r. *J. Gen. Microbiol.*, **117**, 127–134.
 16. Ferguson, G.P., Booth, I.R. (1998) Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methylglyoxal and maintenance of intracellular K⁺. *J. Bacteriol.*, **180**, 4314–4318.
 17. MacLean, M.J., Ness, L.S., Ferguson, G.P., Booth, I.R. (1998) The role of glyoxalase I in the detoxification of methylglyoxal and in the activation of the KefB K⁺ efflux system in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **27**, 563–571.
 18. Kizil, G., Wilks, K., Wells, D., Ala'Aldeen, D.A. (2000) Detection and characterisation of the genes encoding glyoxalase I and II from *Neisseria meningitidis*. *J. Med Microbiol.*, **49**, 669–673.
 19. Sukdeo, N., Honek, J.F. (2008) Microbial glyoxalase enzymes: metalloenzymes controlling cellular levels of methylglyoxal. *Drug Metabol Drug Interact.*, **23**, 29–50.
 20. Kline, E.S., Mahler, H.R. (1965) The lactic dehydrogenases of *E. coli*. *Ann. NY Acad. Sci.* **119**, 905–919.
 21. Gaballa, A., Newton, G.L., Antelmann, H., Parsonage, D., Upton, H., Rawat, M., Claiborne, A., Fahey, R.C., Helmann, J.D. (2010) Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in *Bacilli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 6482–6486.
 22. Chandransu, P., Dusi, R., Hamilton, C.J., and Helmann, J.D. (2014) Methylglyoxal resistance in *Bacillus subtilis*: contributions of bacillithiol-dependent and independent pathways. *Mol. Microbiol.*, **91**, 706–715.
 23. Newton, G.L., Buchmeier, N., Fahey, R.C. (2008) Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 471–494.
 24. Oren, A., Gurevich, P. (1995) Occurrence of the methylglyoxal bypass in halophilic Archaea. *FEMS Microbiol. Lett.*, **125**, 83–87.
 25. Newton, G.L., Fahey, R.C., Rawat, M. (2012) Detoxification of toxins by bacillithiol in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, **158**, 1117–1126.
 26. Korithoski, B., Levesque, C.M., Cvitkovitch, D.G. (2007) Involvement of the detoxifying enzyme lactoylglutathione lyase in *Streptococcus mutans* aciduricity. *J. Bacteriol.*, **189**, 7586–7592.
 27. Chakraborty, S., Gogoi, M., Chakravorty, D. (2015) Lactoylglutathione lyase, a critical enzyme in methylglyoxal detoxification, contributes to survival of *Salmonella* in the nutrient rich environment. *Virulence*, **6**, 50–65.
 28. Marmstal, E., Mannervik, B. (1979) Purification, characterization and kinetic studies of glyoxalase-I from rat-liver. *Biochim. Biophys. Acta.*, **566**, 362–370.
 29. Shih, M.J., Edinger, J.W., Creighton, D.J. (1997) Diffusion-dependent kinetic properties of glyoxalase I and estimates of the steady-state concentrations of glyoxalase-pathway intermediates in glycolyzing erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **244**, 852–857.
 30. Misra, K., Banerjee, A.B., Ray, S., Ray, M. (1995) Glyoxalase-III from *Escherichia coli* – A single novel enzyme for the conversion of methylglyoxal into D-lactate without reduced glutathione. *Biochem. J.*, **305**, 999–1003.

31. Subedi, K.P., Choi, D., Kim, I., Min, B., Park, C. (2011) Hsp31 of *Escherichia coli* K-12 is glyoxalase III. *Mol. Microbiol.*, **81**, 926–936.
32. Benov, L., Sequeira, F., Beema, A.F. (2004) Role of rpoS in the regulation of glyoxalase III in *Escherichia coli*. *Acta Biochim. Pol.*, **51**, 857–860.
33. Szwegold, B.S. (2013) Maillard reactions in hyperthermophilic Archaea: implications for better understanding of non-enzymatic glycation in Biology. *Rejuvenation research*, **16**, 259–272.
34. Totemeyer, S., Booth, N.A., Nichols, W.W., Dunbar, B., Booth, I.R. (1998) From famine to feast: the role of methylglyoxal production in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **27**, 553–562.
35. Cooper, R.A. (1984) Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.*, **38**, 49–68.
37. Hopper, D.J., Cooper R.A. (1971) The regulation of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase: a new control of glycolysis. *FEBS Lett.*, **13**, 213–216.
38. Freedberg, W.B., Kistler, W.S., Lin, E.C.C. (1971) Lethal synthesis of methylglyoxal by *Escherichia coli* during unregulated glycerol metabolism. *J. Bacteriol.*, **108**, 137–144.
39. Booth, I.R., Ferguson, G.P., Miller, S., Li, C., Gunasekera, B., Kinghorn, S. (2003) Bacterial production of methylglyoxal: a survival strategy or death by misadventure? *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1406–1408.
40. Ferguson, G.P., Chacko, A.D., Lee, C., Booth, I.R. (1996) The activity of the high-affinity K⁺ uptake system Kdp sensitizes cells of *Escherichia coli* to methylglyoxal. *J. Bacteriol.*, **178**, 3957–3961.
41. Ferguson, G.P. (1999) Protective mechanisms against toxic electrophiles in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.*, **7**, 242–247.
42. Russell, J.B. (2007) The energy spilling reactions of bacteria and other organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 1–11.
43. Игамбердиев, А.У. (1995) Логика организации живых систем, Воронеж: Издательство Воронежского университета, 152 с.
44. Qian, H., Beard, D.A. (2006) Metabolic futile cycles and their functions: a systems analysis of energy and control. *Syst. Biol. (Stevenage)*, **153**, 192–200.
45. D'Ari, R., Casadesus, J. (1998) Underground metabolism. *Bioessays*, **20**, 181–186.
46. Notebaarta, R.A., Szappano, B., Kintses, B., Pál, F., Györkei, A., Bogos, B., Lázár, V., Spohn, R., Csörgo, B., Wagner, A., Ruppin, E., Pál, C., Papp, B. (2014) Network-level architecture and the evolutionary potential of underground metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111**, 11762–11767.
47. Ozyamak, E., Black, S.S., Walker, C.A., Maclean, M.J., Bartlett, W., Miller, S., Booth, I.R. (2010) The critical role of S-lactoylglutathione formation during methylglyoxal detoxification in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **78**, 1577–1590.
48. Mitsumoto, A., Kim, K.R., Oshima, G., Kunimoto, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nakagawa, Y. (1999) Glyoxalase I is a novel nitric-oxide-responsive protein. *Biochem. J.*, **344**, 837–844.
49. Mitsumoto, A., Kim, K.R., Oshima, G., Kunimoto, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nakagawa, Y. (2000) Nitric oxide inactivates glyoxalase I in cooperation with glutathione. *J. Biochem.*, **128**, 647–654.
50. Sahoo, R., Sengupta, R., Ghosh, S. (2003) Nitrosative stress on yeast: inhibition of glyoxalase-I and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the presence of GSNO.

- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 665–670.
51. Birkenmeier, G., Stegemann, C., Hoffmann, R., Günther, R., Huse, K., Birkemeyer, C. (2010) Posttranslational modification of human glyoxalase I indicates redox-dependent regulation. *PLoS One*, **5**, e10399.
 52. De Hemptinne, V., Rondas, D., Toepoel, M., Vancompernelle, K. (2009) Phosphorylation on Thr-106 and NO-modification of glyoxalase I suppress the TNF-induced transcriptional activity of NF-kappaB. *Mol. Cell Biochem.*, **325**, 169–178.
 53. Zhu, M.M., Skraly, F.A., Cameron, D.C. (2001) Accumulation of methylglyoxal in anaerobically grown *Escherichia coli* and its detoxification by expression of the *Pseudomonas putida* glyoxalase I gene. *Metab. Eng.*, **3**, 218–225.
 54. Trujillo, C., Blumenthal, A., Marrero, J., Rhee, K.Y., Schnappinger, D., Ehrst, S. (2014) Triosephosphate isomerase is dispensable *in vitro* yet essential for *Mycobacterium tuberculosis* to establish infection. *MBio*, **5**, e00085.
 55. Hipkiss, A.R. (2011) Energy metabolism and ageing regulation: metabolically driven deamidation of triosephosphate isomerase may contribute to proteostatic dysfunction. *Ageing Res. Rev.*, **10**, 498–502.
 56. Beisswenger, P.J., Howell, S.K., Smith, K., Szwergold, B.S. (2003) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as an independent modifier of methylglyoxal levels in diabetes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1637**, 98–106.
 57. Kadner, R.J., Murphy, G.P., Stephens, C.M. (1992) Two mechanisms for growth inhibition by elevated transport of sugar phosphates in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2007–2014.
 58. Bond, D.R., Russell, J.B. (1998) Relationship between intracellular phosphate, proton motive force, and rate of nongrowth energy dissipation (energy spilling) in *Streptococcus bovis* JB1. *Appl Environ Microbiol.*, **64**, 976–981.
 59. Kim, I., Kim, E., Yoo, S., Shin, D., Min, B., Song, J., Park, C. (2004) Ribose utilization with an excess of mutarotase causes cell death due to accumulation of methylglyoxal. *J. Bacteriol.*, **186**, 7229–7235.
 60. Bond, D.R., Russell, J.B. 1998 Relationship between intracellular phosphate, proton motive force, and rate of nongrowth energy dissipation (energy spilling) in *Streptococcus bovis* JB1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 976–981.
 61. Cook, G.M., Russell, J.B. 1994 Energy-spilling reactions of *Streptococcus bovis* and resistance of its membrane to proton conductance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1942–1948.
 62. Weber, J., Kayser, A., Rinas, U. (2005) Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. II. Dynamic response to famine and feast, activation of the methylglyoxal pathway and oscillatory behaviour. *Microbiology*, **151**, 707–716.
 63. Russell, J.B. (1993) Glucose toxicity in *Prevotella ruminicola*: methylglyoxal accumulation and its effect on membrane physiology. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2844–2850.
 64. Kosmachevskaya, O.V., Topunov, A.F. (2009) Existence of glycated leghemoglobin – hemoglobin of legume plants, *IMARS Highlights*, **4**(5), 10–13.
 65. Kosmachevskaya, O.V., Topunov, A.F. (2010) Formation of glycated recombinant leghemoglobin in *Escherichia coli* cells. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **46**, 297–302.
 66. Mironova, R., Niwa, T., Dimitrova, R., Boyanov, M., Ivanov, I. (2003) Glycation and posttranslational pro-

- cessing of human interferon gamma expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 51068–51074.
67. Mironova, R., Niwa, T., Handzhiyski, Y., Sredovska, A., Ivanov, I. (2005) Glycation and post-translational processing of human interferon-gamma expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 51068–51074.
68. Maiden, M.F.J., Pham, C., Kashket, S. (2004) Glucose toxicity effect and accumulation of methylglyoxal by the periodontal pathogen *Bacteroides forsythus*. *Anaerobe*, **10**, 27–32.
69. Richard, J.P. (1993) Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem. Soc. Trans.*, **21**, 549–553.
70. Phillips, S.A., Thornalley, P.J. (1993) The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.*, **212**, 101–105.
71. Ationu, A., Humphries, A. (1998) The feasibility of replacement therapy for inherited disorder of glycolysis: triosephosphate isomerase deficiency. *Int. J. Mol. Med.*, **2**, 701–704.
72. Ahmed, N., Battah, S., Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Horányi, M., Baróti, K., Hollan, S., Thornalley, P.J. (2003) Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, **1639**, 121–132.
73. Orosz, F., Ol'ah, J., Ov'adi, J. (2009) Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1792**, 1168–1174.
74. Selvamani, V.R.S., Telaar, M., Friehs, K., Flaschel, E. (2014) Antibiotic-free segregational plasmid stabilization in *Escherichia coli* owing to the knockout of triosephosphate isomerase (tpiA). *Microb. Cell Fact.*, **13**, 58.
75. Solem, C., Koebmann, B., Jensen, P.R. (2008) Control analysis of the role of triosephosphate isomerase in glucose metabolism in *Lactococcus lactis*. *IET Syst. Biol.*, **2**, 64–72.
76. Souza, J.M., Radi, R. (1998) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, **360**, 187–194.
77. Mohr, S., Stamler, J.S., Brüne, B. (1994) Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents. *FEBS Lett.*, **348**, 223–227.
78. Padgett, C.M., Whorton, A.R. (1995) S-nitrosoglutathione reversibly inhibits GAPDH by S-nitrosylation. *Am. J. Physiol.*, **269**, 739–749.
79. Galli, F., Rovidati, S., Ghibelli, L., Canestrari, F. (1998) S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase decreases the enzyme affinity to the erythrocyte membrane. *Nitric Oxide*, **2**, 17–27.
80. Mohr, S., Hallak, H., de Boitte, A., Lapetina, E.G., Brüne, B. (1999) Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 9427–9430.
81. Ishii, T., Sunami, O., Nakajima, H., Nishio, H., Takeuchi, T., Hata, F. (1999) Critical role of sulfenic acid formation of thiols in the inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 133–143.
82. Leoncini, G., Maresca, M., Bon-signore, A. (1980) The effect of methylglyoxal on the glycolytic enzymes. *FEBS Lett.*, **117**, 17–18.
83. Morgan, P.E., Dean, R.T., Davies, M.J. (2002) Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation glycoxidation products. *Arch. Biochem. Biophys.*, **403**, 259–269.

84. Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., Devin, A. (2011) The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta*, **1807**, 568–576.
85. Magasanik, B. (1961) Catabolite repression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **26**, 249–256.
86. Pastan, I., and Perlman, R. (1970) Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. *Science*, **169**, 339–344.
87. Ackerman, R.S., Cozzarelli, N.R., Epstein, W. (1974) Accumulation of toxic concentrations of methylglyoxal by wild-type *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **119**, 357–362.
88. Bächli, B., Kornberg, H.L. (1975) Utilization of gluconate by *Escherichia coli*. A role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the induction of gluconate catabolism. *Biochem. J.*, **150**, 123–128.
89. Peekhaus, N., Conway, T. (1998) What's for Dinner?: Entner-Doudoroff Metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **180**, 3495–3502.
90. Puskas, R., Fredd, N., Gazdar, C., Peterkofsky, A. (1983). Methylglyoxal-mediated growth inhibition in an *Escherichia coli* cAMP receptor protein mutant. *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 503–513.
91. Burke, R.M., Tempest, D.W. (1990) Growth of *Bacillus stearothermophilus* on glycerol in chemostat culture: expression of an unusual phenotype. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 1381–1385.
92. Russell, J.B., Cook, G.M. (1995) Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.*, **59**, 48–62.
93. Xu, D., Liu, X., Guo, C., Zhao, J. (2006) Methylglyoxal detoxification by an aldo-keto reductase in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Microbiology*, **152**, 2013–2021.
94. Koobs, D.H. (1972) Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. *Science*, **178**, 127–133.
95. Iddar, A., Valverde, F., Assobhei, O., Serrano, A., Soukri, A. (2005) Widespread occurrence of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase among gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.*, **8**, 251–258.
96. Ito, F., Miyake, M., Fushinobu, S., Nakamura, S., Shimizu, K., Wakagi, T. (2014) Engineering the allosteric properties of archaeal non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1844**, 759–766.
97. Dan'shina, P.V., Schmalhausen, E.V., Arutiunov, D.Y., Pleten', A.P., Muronetz, V.I. (2003) Acceleration of glycolysis in the presence of the non-phosphorylating and the oxidized phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 593–600.
98. Danshina, P.V., Schmalhausen, E.V., Avetisyan, A.V., Muronetz, V.I. (2001) Mildly oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a possible regulator of glycolysis. *IUBMB Life.*, **51**, 309–314.
99. Crabtree, H.G. (1929) Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.*, **23**, 536–545.
100. Vemuri, G.N., Altman, E., Sangurdekar, D.P., Khodursky, A.B., Eiteman M.A. (2006) Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: Transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3653–3661.
101. Paczia, N., Nilgen, A., Lehmann, T., Gätgens, J., Wiechert, W., Noack, S. (2012) Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms. *Microbial Cell Factories*, **122**, 1–14.

102. Molenaar, D., van Berlo, R., de Ridder, D., Teusink, B. (2009) Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Mol. Syst. Biol.*, **5**, 323.
103. Евтодиенко, Ю.В., Теплова, В.В. (1996) Биологическое значение и механизмы реализации эффекта Кребтри в быстро пролиферирующих клетках. Роль ионов Ca^{2+} . *Биохимия*, **61**, 1995–2004.
104. Lele, U.N., Watve, M.G. (2014) Bacterial growth rate and growth yield: Is there a relationship? *Proc. Indian. Natn. Sci. Acad.*, **80**, 537–546.
105. Travisano, M., Velicer, G.J. (2004) Strategies of microbial cheater control. *Trends Microbiol.*, **12**, 72–78.
106. Kreft, J.U., Bonhoeffer, S. (2005) The evolution of groups of cooperating bacteria and the growth rate versus yield trade-off. *Microbiology*, **151**, 637–641.
107. Pfeiffer, T., Morley, A. (2014) An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front. Mol. Biosci.*, **21**, 1–6.
108. Shimizu K., (2014) Regulation systems of bacteria such as *Escherichia coli* in response to nutrient limitation and environmental stresses. *Metabolites*, **4**, 1–35.
109. Sharma, P., Hellingwerf, K.J., de Mattos, M.J.T., Bekker, M. (2012) Uncoupling of substrate-level phosphorylation in *Escherichia coli* during glucose-limited growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 6908–6913.
110. Lowry, O.H., Carter, J., Ward, J.B., Glaser, L. (1971) The effect of carbon and nitrogen sources on the level of metabolic intermediates in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **246**, 6511–6521.
111. Schaefer, U., Boos, W., Takors, R., Weuster-Botz, D. (1999) Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal. Biochem.*, **270**, 88–96.
112. Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J.W., Mauch, K., Reuss, M. (2002) Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, **79**, 53–73.
113. Russell, J.B. (1992) Glucose toxicity and inability of *Bacteroides ruminicola* to regulate glucose transport and utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2040–2045.
114. Emmerling, M., Dauner, M., Ponti, A., Fiaux, J., Hochuli, M., Szyperski, T., Wu¨thrich, K., Bailey J.E., Sauer, U. (2002) Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **184**, 152–164.
115. Sandén, A.M., Prytz, I., Tubulekas, I., Förberg, C., Le, H., Hektor, A., Neubauer, P., Pragai, Z., Harwood, C., Ward, A., Picon, A., de Mattos, T.J., Postma, P., Farewell, A., Nystrom, T., Reeh, S., Pedersen, S., Larsson, G. (2003) Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnol. Bioeng.*, **81**, 158–166.
116. Sikorski, M.M., Topunov, A.F., Strozycki, P., Vorgias, C.E., Wilson, K.S., Legocki, A.B. (1995) Cloning and expression of plant leghemoglobin cDNA of *Lupinus luteus* in *Escherichia coli* and purification of the recombinant protein. *Plant Science*, **108**, 109–117.
117. Wang, H., Wang, F., Wang, W., Yao, X., Wei, D., Cheng, H., Deng, Z. (2014) Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PLoS One*, **9**, e112777.
118. Kosmachevskaya, O.V., Shumaev, K.B., Nasybullina, E.I., Gubkina, S.A., Topunov, A.F. (2013) Interaction of S-nitrosoglutathione with methemoglobin under conditions of modeling carbonyl stress. *Hemoglobin*, **37**, 205–218.

119. Kosmachevskaya, O.V., Shumaev, K.B., Nasybullina, E.I., Topunov, A.F. (2014) Formation of nitri- and nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*, **52**, 161–168.
120. Maiden, M.F.J., Pham, C., Kashket, S. (2004) Glucose toxicity effect and accumulation of methylglyoxal by the periodontal pathogen *Bacteroides forsythus*. *Anaerobe*, **10**, 27–32.
121. Bechara, E.J., Dutra, F., Cardoso, V.E., Sartori, A., Olympio, K.P., Penatti, C.A., Adhikari, A., Assunção, N.A. (2007) The dual face of endogenous alpha-aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, **146**, 88–110.
122. Mathys, K.C., Ponnampalam, S.N., Padival, S., Nagaraj, R.H. (2002) Semicarbazide-sensitive amine oxidase in aortic smooth muscle cells mediates synthesis of a methylglyoxal-AGE: implications for vascular complications in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 863–869.
123. O'Sullivan, J., Unzeta, M., Healy, J., O'Sullivan, M.I., Davey, G., Tipton, K.F. (2004) Semicarbazide-sensitive amine oxidases: enzymes with quite a lot to do. *Neurotoxicology*, **25**, 303–315.
124. Sartori, A., Mano, C.M., Mantovani, M.C., Dyszy, F.H., Massari, J., Tokikawa, R., Nascimento, O.R., Nantes, I.L., Bechara, E.J. (2013) Ferricytochrome (c) directly oxidizes aminoacetone to methylglyoxal, a catabolite accumulated in carbonyl stress. *PLoS One*, **8**, e57790.
125. Dutra, F., Knudsen, F.S., Curi, D., Bechara, E.J.H. (2001) Aerobic oxidation of aminoacetone, a threonine catabolite: iron catalysis and coupled iron release from ferritin. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1323–1329.
126. Turner, J.M. (1966) Microbial metabolism of amino ketones. Aminoacetone formation from 1-aminopropan-2-ol by a dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **99**, 427–433.
127. Boylan, S.A., Dekker, E.E. L-threonine dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.*, **256**, 1809–1815.
128. Elliott, W.H. (1960) Aminoacetone formation by *Staphylococcus aureus*. *Biochem J.*, **74**, 478–485.
129. Green, M.L., Elliott, W.H. (1964) The enzymic formation of aminoacetone from threonine and its further metabolism. *Biochem J.*, **92**, 537–549.
130. Neuberger, A., Tait, G.H. (1962) Production of aminoacetone by *Rhodospseudomonas spheroids*. *Biochem. J.*, **84**, 317–328.
131. Faulkner, A., Turner, J.M. (1974) Microbial metabolism of amino alcohols. Aminoacetone metabolism via 1-aminopropan-2-ol in *Pseudomonas sp.* N.C.I.B. 8858. *Biochem J.*, **138**, 263–276.
132. Green M.L. Lewis J.B. (1968) The oxidation of aminoacetone by a species of *Arthrobacter*. *Biochem J.*, **106**, 267–270.
133. Rahhar, D.A., Turner, J.M., Willetts, A.I. (1967) The role of aminoacetone in L-threonine metabolism by *Bacillus subtilis*. *Biochem J.*, **103**, 73–73.
134. Willetts, A.J., Turner, J.M. (1970). Threonine metabolism in a strain of *Bacillus subtilis*: enzymic oxidation of the intermediate DL-lactaldehyde. *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 234–236.
135. Machielsen R, Van der Oost, J. (2006) Production and characterization of a thermostable L-threonine dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *FEBS Journal*, **273**, 2722–2729.

136. Bell, S.C., Turner, J.M. (1976) Bacterial catabolism of threonine. Threonine degradation initiated by L-threonine NAD⁺ oxidoreductase. *Biochem J.*, **156**, 449–458.
137. Newman, E.B., Kapoor, V., Potter, R. (1976) Role of L-threonine dehydrogenase in the catabolism of threonine and synthesis of glycine by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **126**, 1245–1249.
138. Potter, R., Kapoor, V., Newman, E.B. (1977) Role of threonine dehydrogenase in *Escherichia coli* threonine degradation. *Bacteriol.* **132**, 385–391.
139. Tressel, T., Thompson, R., Zieske, L.R., Menendez, M.I., Davis, L. (1986) Interaction between L-threonine dehydrogenase and aminoacetone synthetase and mechanism of aminoacetone production. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16428–16437.
140. Higgins, I.J., Turner J.M. (1969) Enzymes of methylglyoxal metabolism in a Pseudomonad which rapidly metabolizes aminoacetone. *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 464–467.
141. Takors, R., Bathe, B., Rieping, M., Hans, S., Kelle, R., Huthmacher, K. (2007) Systems biology for industrial strains and fermentation processes—example: amino acids. *J. Biotechnol.*, **129**, 181–190.
142. Lee, K.H., Park, J.H., Kim, T.Y., Kim, H.U., Lee, S.Y. (2007) Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Mol. Syst. Biol.*, **3**, 149.
143. Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I., Brownlee, M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, **404**, 787–790.
144. Xie, L., Eiteman, M.A., Altman, E. (2003) Production of 5-aminolevulinic acid by an *Escherichia coli* aminolevulinic acid dehydratase mutant that overproduces *Rhodobacter sphaeroides* aminolevulinic acid synthase. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1751–1755.
145. Hiraku, Y., Kawanishi, S. (1999) Involvement of oxidative DNA damage and apoptosis in antitumor actions of aminosugars. *Free Radic. Res.*, **31**, 389–403.
146. Sartori, A., Mano, C.M., Mantovani, M.C., Dyszy, F.H., Massari, J., Tokikawa, R., Nascimento, O.R., Nantes, I.L., Bechara, E.J. (2013) Ferricytochrome (c) directly oxidizes aminoacetone to methylglyoxal, a catabolite accumulated in carbonyl stress. *PLoS One*, **8**, e57790.
147. Szent-Gyorgyi, A., Egyiid, L.G., McLaughlin, J.A. (1967) Ketoaldehydes and cell division. *Science*, **155**, 539–541.
148. Egyud, L.G. (1967) Studies on cell division: the effect of aldehydes, ketones, and a-ketoaldehydes on the proliferation of *Escherichia coli*. *Curr. Mol. Biol.*, **1**, 14–20.
149. Egyud, L.G., Szent-Gyorgyi, A. (1966) On the regulation of cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 203–207.
150. Campbell, A.K., Naseem, R., Holland, I.B., Matthews, S.B., Wann, K.T. (2007) Methylglyoxal and other carbohydrate metabolites induce lanthanum-sensitive Ca²⁺-transients and inhibit growth in *E. coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **468**, 107–113.
151. Rosas-Lemus, M., Uribe-Alvarez, C., Chiquete-Félix, N., Uribe-Carvajal, S. (2014) In *Saccharomyces cerevisiae* fructose-1,6-bisphosphate contributes to the Crabtree effect through closure of the mitochondrial unspecific channel.

- Arch. Biochem. Biophys.*, **555–556**, 66–70.
152. Naseem R., Davies S.R., Jones H., Wann K., Holland I.B., Campbell A.K. (2007) Cytosolic Ca²⁺ regulates protein expression in *E. coli* through release from inclusion bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **360**, 33–39.
153. Dhar, N., McKinney, J.D. (2007) Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 30–38.
154. Girgis, H.S., Harrisa, K., Tavazoiea, S. (2012) Large mutational target size for rapid emergence of bacterial persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 12740–12745.
155. Rachman, H., Kim, N., Ulrichs, T., Baumann, S., Pradl, L., Eddine, A.N., Bild, M., Rother, M., Kuban, R.-J., Lee, J.S., Hurwitz, R., Brinkmann, V., Kosmiadi, G.A., Kaufmann, S.H.E. (2006) Critical role of methylglyoxal and AGE in mycobacteria-induced macrophage apoptosis and activation. *PLoS One*, **1**, e29.
156. Rachman, H., Strong, M., Ulrichs, T., Grode, J.L., Schuchhardt, J., Mollenkopf, H., Kosmiadi, G.A., Eisenberg, D., Kaufmann, S.H.E. (2006) Unique transcriptome signature of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.*, **74**, 1233–1242.
157. Gray, M.J., Wholey, W.Y., Parker, B.W., Kim, M., Jakob, U. (2013) NemR is a bleach-sensing transcription factor. *J. Biol. Chem.*, **288**, 13789–13798.
158. Lee, C., Shin, J., Park, C. (2013) Novel regulatory system *nemRA-gloA* for electrophile reduction in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.*, **88**, 395–412.
159. Ozyamak, E., de Almeida, C., de Moura, A.P.S., Miller, S., Booth, I.R. (2013) Integrated stress response of *Escherichia coli* to methylglyoxal: transcriptional read-through from the *nemRA* operon enhances protection through increased expression of glyoxalase I. *Molecular Microbiology*, **88**, 936–950.
160. Bakker, E.P., Mangerich, W.E. (1982) *N*-ethylmaleimide induces K⁺ - H⁺ antiport activity in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.*, **140**, 177–180.
161. Elmore, M.J., Lamb, A.J., Ritchie, G.Y., Douglas, R.M., Munro, A., Gajewska, A., Booth, I.R. (1990) Activation of potassium efflux from *Escherichia coli* by glutathione metabolites. *Mol. Microbiol.*, **4**, 405–412.
162. Ferguson, G.P., Munro, A.W., Douglas, R.M., McLaggan, D., Booth, I.R. (1993) Activation of potassium channels during metabolite detoxification in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **9**, 1297–1303.
163. Miller, S., Ness, L.S., Wood, C.M., Fox, B.C., Booth, I.R. (2000) Identification of an ancillary protein, YabF, required for activity of the KefC glutathione-gated potassium efflux system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **182**, 6536–6540.
164. Roosild, T.P., Castronovo, S., Miller, S., Li, C., Rasmussen, T., Bartlett, W., Gunasekera, B., Choe, S., Booth, I.R. (2009) KTN (RCK) domains regulate K⁺ channels and transporters by controlling the dimer-hinge conformation. *Structure*, **17**, 893–903.
165. Ozyamak, E., Black, S.S., MacLean, M.J., Bartlett, W., Miller, S., Booth, I.R. (2011) The critical role of S-lactoylglutathione formation during methylglyoxal detoxification in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **78**, 1577–1590.
166. Rekart, U.D., Zwaig, N., Istúriz, T. (1973) Accumulation of methylglyoxal in a mutant of *Escherichia*

- coli* constitutive for gluconate catabolism. *J. Bacteriol.*, **115**, 727–731.
167. Baskaran, S., Rajan, D.P., Balasubramanian, K.A. (1989) Formation of methylglyoxal by bacteria isolated from human faeces. *J. Med. Microbiol.*, **28**, 211–215.
168. Kashket, S., Maiden, M.F., Haffajee, A.D., Kashket, E.R. (2003) Accumulation of methylglyoxal in the gingival crevicular fluid of chronic periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.*, **30**, 364–367.
169. Chakraborty, S., Karmakar, K., Chakravorty, D. (2014) Cells producing their own nemesis: understanding methylglyoxal metabolism. *IUBMB Life*, **66**, 667–678.
170. Campbell, A.K., Matthews, S.B., Vassel, N., Cox, C.D., Naseem, R., Chaichi, J., Holland, I.B., Greene, J., Wann, K.T. (2010) Bacterial metabolic ‘toxins’: A new mechanism for lactose and food intolerance, and irritable bowel syndrome. *Toxicology*, **278**, 268–276.
171. Wendisch V.F., Lindner S.N. Meiswinkel T.M. (2011) Use of Glycerol in biotechnological applications. *Biodiesel – quality, emissions and by-products*, G. Montero (Ed.), DOI: 10.5772/25338, P. 305–340.
172. Clomburg, J.M., Gonzalez, R. (2011) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1,2-propanediol from glycerol. *Bio-technol. Bioeng.*, **108**, 867–879.