

УДК: 57.084.1

## ***DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM* КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ В БИОЛОГИИ**

**Завалиева Д.П.<sup>1</sup>, Цыбина А.Н.<sup>1</sup>, Кубышкина Д.В.<sup>1</sup>, Андреюк О. А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, направление подготовки «Биология», Волгоград, Россия, e-mail: [zavalieva2017@yandex.ru](mailto:zavalieva2017@yandex.ru)

Использование простых организмов для понимания молекулярной и клеточной функции сложных процессов имеет важное значение для быстрого развития биомедицинских исследований. Так, в данной статье рассматривается клеточный слизевик *Dictyostelium discoideum* (диктиостелиум) как один из важных модельных организмов, который традиционно использовался для понимания основных принципов клеточной и эволюционной биологии и в настоящее время также стал полезной системой в биомедицинских исследованиях. Особенно на нем изучают подвижность и хемотаксис клеток, межклеточную адгезию и в последнее время особое внимание уделяется изучению таких процессов как аутофагия и фагоцитоз. Так как, чтобы выжить во враждебной среде обитания, у клеточных слизевиков *Dictyostelium discoideum* развились антимикробные реакции, которые переплетаются с фагоцитозом и аутофагией, их путями приобретения питательных веществ. Основные механизмы и противомикробные функции этих путей сохраняются в мононуклеарных фагоцитах млекопитающих, которые опосредуют первоначальный, врожденный иммунный ответ на инфекцию. Поэтому в этом обзоре мы рассматриваем *Dictyostelium discoideum* в качестве модельного фагоцита для изучения взаимодействий между внутриклеточными патогенами и клеточно-автономными механизмами защиты клеток мононуклеарно-фагоцитарной системы и описываем аутофагию как защитный путь, который реагирует, когда фагоцитоз не справляется с устранением инфекции.

Ключевые слова: диктиостелиум, модельный организм, мононуклеарно-фагоцитарная система, фагоцитоз, аутофагия

## ***DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM* AS A MODEL OBJECT IN BIOLOGY**

**Zavalieva D.P.<sup>1</sup>, Tsybina A. N.<sup>1</sup>, Kubyshkina D. V.<sup>1</sup>, Andreyuk O. A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>FSBEI HE VolgGMU of the Ministry of Health of the Russian Federation – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Volgograd State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation direction of preparation "Biology", Volgograd, Russia, e-mail: [zavalieva2017@yandex.ru](mailto:zavalieva2017@yandex.ru)

The use of simple organisms to understand the molecular and cellular functions of complex processes is very

important for the rapid development of biomedical research. So in this article, the cellular mucus *Dictyostelium discoideum* (*dictyostelium*) is considered as one of the important model organisms that was traditionally used to understand the basic principles of cell and evolutionary biology and now has become a useful system in biomedical research. Especially it is used to study the cells motility and chemotaxis, intercellular adhesion, and recently, special attention is paid to the study of processes such as autophagy and phagocytosis. Since, in order to survive in a hostile environment, the *Dictyostelium discoideum* cell mucus developed antimicrobial reactions that are intertwined with phagocytosis and autophagy receiving nutritional deficiencies. The main mechanisms and antimicrobial functions of these pathways are preserved in mammalian mononuclear phagocytes, which mediate the initial, innate immune response to infection. Therefore, in this survey we consider *Dictyostelium discoideum* as a model phagocyte for studying interactions between intracellular pathogens and cell-autonomous cell defense mechanisms of the mononuclear-phagocytic system and describe autophagy as a protective pathway that responds when phagocytosis fails to eliminate the infection.

Keywords: dictyostelium, model organisms, the mononuclear phagocyte system, phagocytosis, autophagy

## Введение

Диктиостелиум (*Dictyostelium discoideum*) является клеточным слизевиком, относящимся к типу *Mycetozoa*. Диктиостелиум был описан в 1935 г. и вскоре стал одним из важных модельных организмов в клеточной биологии, биологии развития и генетике. Важно отметить, что *D. discoideum* сохранил гены, участвующие в процессах, таких как фагоцитоз, макропиноцитоз, хемотаксис и подвижность. Кроме того, *D. discoideum* оказался хорошим модельным организмом для решения вопросов, касающихся этиологии некоторых заболеваний человека; например, ортологи генов, вовлеченных в неврологические расстройства, такие как нейрональный цероидный липофусциноз, хореа-акантоцитоз, болезнь Альцгеймера и лиссэнцефалия. Многие механизмы врожденного иммунитета, используемые фагоцитами животных, схожи с *D. discoideum*. Исследования с использованием этой амёбы в качестве модельного организма расширили знания о молекулярных механизмах инфекции и взаимодействии патоген–хозяин.

*D. discoideum* имеет необычный жизненный цикл, который чередуется между одноклеточными и многоклеточными фазами. Как одноклеточная амёба, *D. discoideum* питается бактериями и дрожжами и размножается делением примерно каждые 8 ч. Так, в зависимости от внешних условий диктиостелиум может быть единым многоклеточным организмом или скоплением независимых одноклеточных. Независимо друг от друга клетки живут тогда, когда среда богата пищей. В случае истощения запасов, некоторые клетки начинают подавать сигнал тревоги посредством выделения специального вещества (циклического аденозинмонофосфата), воспринимаемого микроорганизмами в качестве своеобразного «SOS». К издающему сигналы лидеру начинают сползаться остальные клетки, вследствие чего образуется единый плазмодий. Он начинает двигаться, причем значительно

быстрее по сравнению с отдельными клетками. Образовавшийся организм начинает поиск пищи. Если найдет, вновь рассыпается на составляющие [4].

Интересно, что *D. discoideum* защищает себя от патогенов как в виде одной клетки, так и в виде многоклеточного организма. Внутри слизняка, подмножество специализированных фагоцитарных клеток, называемых сторожевыми клетками, функционируют как примитивная врожденная иммунная система и патрулируют факультативный многоклеточный организм, чтобы очистить и убить вторгающиеся микробы путем фагоцитоза [10].

В процессе развития клетки *D. discoideum* полагаются на аутофагию для получения энергии и метаболитов, необходимых для агрегации и дифференцировки [8].

### **Основная часть**

Диктиостелиум обитает в лесной подстилке, занимая пограничное положение между одноклеточными и многоклеточными. *D. discoideum* относится к слизевым грибам, поскольку он рассеивает по ветру споры из плодового тела подобно всем грибам.

Споры прорастают в виде подвижных амёб (миксамёб), охотящихся за бактериями. Когда же наступает голодная пора, амёбы сползаются, образуя подвижный многоклеточный слизевик. Затем слизевик «оседает» и образует стебель, на вершине которого формируется плодовое тело, рассеивающее споры. Так замыкается жизненный цикл диктиостелиума.

Интересно, что кооперация не обходится без жертв: до 20% собравшихся воедино амёб погибает, жертвуя собой на благо общего дела. Поскольку амёбы собираются по территориальному признаку, то они принадлежат к разным клонам, и слизевик представляет собой генетическую химеру из клеток разных клонов.

Рассмотрим жизненный цикл *D. discoideum*. Споры диктиостелиума высвобождаются из зрелых плодовых тел и разносятся с помощью ветра. При условии достаточно высокой температуры и влажности, из спор выходят миксамёбы, представляющие собой одноклеточную стадию развития диктиостелиума. В случае наличия пищи и сохранения достаточной влажности, миксамёбы питаются и делятся митозом. Миксамёб привлекает фолиевая кислота, которую выделяют бактерии.

В случае исчерпания пищи начинается агрегация миксамёб. В ходе данной стадии в клетках миксамёб экспрессируются аденилатциклаза и специфические гликопротеиды. Аденилатциклаза синтезирует цАМФ, гликопротеидами обеспечивается межклеточная адгезия. Секретируемый в среду цАМФ служит сигналом «клеточного голода», также как у бактерий. У *D. discoideum* цАМФ также является хемоаттрактантом для голодных миксамёб.

Центром служат несколько случайно оказавшихся рядом миксамёб, которые «склеились» первыми. К этому центру привлекаются и ползут со всех сторон голодные миксамёбы, которые соединяются с помощью молекул клеточной адгезии и образуют агрегат, включающий в себя несколько десятков тысяч клеток.

Изначально плоским агрегатом совершаются сложные движения, он приподнимается над субстратом и ложится на бок, превращаясь в мигрирующего «слизня» — подвижный псевдоплазмодий, длина которого составляет 2-4 мм. Псевдоплазмодий мигрирует всё время одним концом вперед, и в его составе начинается дифференцировка клеток; часть клеток на переднем конце образуют полисахаридную оболочку. Движение псевдоплазмодия осуществляется по направлению к свету, большей сухости воздуха и более высокой температуре. Дальнейшая дифференцировка и формирование нескольких типов клеток стимулируются цАМФ и веществом, известным как фактор индукции дифференцировки. На заднем конце псевдоплазмодия оказываются клетки-предшественники спор, на переднем — клетки-предшественники стебелька плодового тела. По окончании миграции в подходящие условия, клетками псевдоплазмодия совершаются сложные перемещения и формируются соответствующие части плодового тела. Открытые сравнительно недавно «сходные с передними» клетки распределены по задней половине тела псевдоплазмодия. Данные клетки формируют подставку. После остановки псевдоплазмодия формируется «стадия сомбреро» за счёт перемещения клеток, после чего начинается кульминационная фаза формирования плодового тела. В процессе данной фазы меняются местами передние и задние клетки псевдоплазмодия. Передние клетки «сомбреро» формируют целлюлозные клеточные стенки и собираются в полый трубчатый стебелек. По наружной поверхности этого трубчатого стебелька происходит миграция клеток-предшественниц спор вверх, а остальных клеток-предшественниц стебелька — вниз. Через 8-10 часов после начала этой фазы образуется полностью сформированное плодовое тело, высота которого составляет 1-2 мм. После созревания спор на его вершине споры рассеиваются, и цикл начинается снова.

Наряду с вышеописанной бесполой частью цикла, жизненный цикл диктиостелиума может включать также половое размножение. Запуск перехода к половому размножению может производиться подсыханием подстилки, в которой живут миксамёбы. Две миксамёбы разных типов спаривания в процессе слияния образуют зиготу — «гигантскую клетку» [9].

Привлекательность данного модельного объекта *D. discoideum* заключается еще в том, что его легко культивировать в лабораторных условиях. Его можно выращивать в жидких средах на чашках Петри, содержащих питательный агар, при комнатной температуре 22-24°C. Также популяцию *D. discoideum* можно культивировать на полусинтетическом

субстрате, содержащего 2% агар, 0, 5% глюкозу, 0,05% дрожжевой экстракт и 0, 5% пептон, либо на аналогичном субстрате, но только без добавления глюкозы. Данные среды готовят на фосфатном буфере ( $\text{KH}_2\text{P}_04$  - 2.25 г/л,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  - 0.87 г/л,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.5 г/л). Перед внесением спор *D. discoideum* на питательные субстраты формируют бактериальный газон из *Escherichia coli*. *E. coli* являются источником накопления фолиевой кислоты в субстрате, что позволяет создать условия приближенные к естественным условиям обитания модельного объекта. Время культивирования составляет 4 дня при температуре 23°C [1].

Сходство с клетками животных делает *D. discoideum* подходящей моделью для решения проблемы изучения генов или процессов, имеющих отношение к заболеваниям человека. Они включают в себя изучение инфекций, патологий, связанных с подвижностью клеток, митохондриальных заболеваний, изучение механизма действия некоторых лекарственных препаратов, рак, нейродегенеративных нарушений. *D. discoideum* также приводятся полезные способы изучения механизмов фагоцитоза и аутофагии. Остановимся на этом поподробнее.

Фагоцитоз-это процесс, который позволяет поглощать инородные частицы и используется клетками мононуклеарно-фагоцитарной системы для поглощения и уничтожения патогенов, а также для активации адаптивного иммунного ответа на чужеродные антигены. Путь созревания фагоцитоза высоко сходен между клетками мононуклеарно-фагоцитарной системы и *D. discoideum*, который использует этот процесс для поглощения питательных веществ. В упрощенном представлении, частица распознается поверхностными рецепторами, и это взаимодействие запускает сигнальный каскад, который стимулирует полимеризацию актина, чтобы деформировать мембрану вокруг частицы. После закрытия фагоцитарного пузырька новообразованная фагосома подвергается созреванию, которое включает целый ряд этапов, необходимых для превращения фагосомы в высококислотный, деструктивный и окислительный компартмент. Обширный протеомный анализ, а также более поздние эксперименты с живой микроскопией продемонстрировали чрезвычайную пластичность этой органеллы и высокую степень сходства путей созревания фагосомы между млекопитающими и *D. discoideum* [2;5].

Многие патогенные микроорганизмы, такие как *L. pneumophila*, *S. enterica* и *Mycobacterium*, со временем приспособились избегать фагоцитоз или нарушать созревание фагосомы, чтобы реплицироваться в клетке-хозяине. Поэтому сам процесс фагоцитоза у *D. discoideum* и то, *D. discoideum* как модель фагоцитов были использованы учеными для расширения знаний о нескольких инфекционных заболеваниях, таких как легионеллез, сальмонеллез и туберкулез. Как было описано выше, фагоцитоз является главным механизмом, с помощью которого *D. discoideum* переваривает внутриклеточные бактерии с целью получения питательных

веществ. Однако, патогенные микробы эволюционировали механизмы для того чтобы освободиться из фагосомы. У *D. discoideum*, как и у других эукариотических фагоцитах, бактериальный побег из фагосомы запускает более строгий катаболический путь, называемый аутофагией, который служит дополнительным защитным механизмом для инфицированных амёб. Аутофагический процесс, посредством которого внутриклеточные патогены и/или их поврежденные фагосомы специфически распознаются и усваиваются, называется ксенофагией [6].

Путь аутофагии состоит из образования, при индукции различными стрессами, такими как окисление, голодание питательных веществ или микробная инфекция. Во время ксенофагии мембраны фагофоры окружают бактерии и/или их поврежденные составные элементы, чтобы окончательно поглотить их в закрытую вакуоль, называемой аутофагосомой, которая при слиянии с лизосомами образует кислотный и деструктивный компартмент, аутолизосому, где бактерии перевариваются [3].

Процесс аутофагии у *D. discoideum* необходим для выживания при голодании, для удаления белковых агрегатов и является также основополагающим при заражении внутриклеточными патогенами. Во время голодания аутофагия отвечает за высвобождение питательных веществ для поддержания жизнеспособности организма. Поэтому дефекты в аутофагии резко снижают способность клеток выживать в длительные периоды депривации питательных веществ. Как правило, дикий тип клеток *D. discoideum* выживают после 10 дней аминокислотного голодания, в то время как аутофагически-дефицитные мутанты начинают терять жизнеспособность уже через 24 ч. Во время голодания аутофагия также отвечает за уменьшение объема клеток и общего белка. *D. discoideum* процесс аутофагии является необходимым так как при отсутствии питательных веществ, внутриклеточная деградация и рециркуляция собственного материала клеток путем аутофагии становится необходимой в качестве источника энергии и простых метаболитов, необходимых для биосинтетических путей, проходящих в процессе развития. Таким образом, неудивительно, что аутофагическая дисфункция приводит к аномальному развитию, что облегчает выявление мутантов аутофагии в лабораторных условиях. Выраженность фенотипа колеблется от полного отсутствия агрегации до образования многовалентных бугорков, которые не способны образовывать нормальные стебли и жизнеспособные споры. Таким образом, функции аутофагии важны для терминальной дифференцировки как спор, так и стеблевых клеток.

Описаны три формы аутофагии: опосредованная шапероном аутофагия, микроавтофагия, и макроавтофагия. Макроавтофагия является известным, наиболее консервативным аутофагическим путем и единственным, описанным в *D. discoideum* на данный момент. Хотя

первоначально считалось, что аутофагия - это просто механизм утилизации питательных веществ путем неселективного саморазрушения, теперь становится ясно огромное значение селективной аутофагии. Селективный процесс включает специфическую деградацию аномальных белковых агрегатов (агрефагия), органелл (митофагия, пексофагия, рибофагия, ретикулофагия, нуклеофагия) или патогенов (ксенофагия). Поэтому считается, что нарушение селективной аутофагии лежит в основе этиологии многих заболеваний.

Отличительной чертой аутофагии является образование внутриклеточных двухмембранных везикул (аутофагосом), которые в конечном итоге сливаются с лизосомами, приводя к деградации дисфункциональных и ненужных компонентов и внутренней мембраны.

Аутофагическая дисфункция может привести к нарушению гомеостаза белков и органелл, связанным с многочисленными заболеваниями человека. Весьма актуальным примером является связь аутофагии с основными нейродегенеративными заболеваниями (в том числе болезнью Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона), часто связанными с накоплением аномальных белковых агрегатов или нефункциональных органелл [7].

## **Вывод**

*Dictyostelium discoideum* является естественным хищником бактерий и должен бороться с тем, что каждый прием пищи является потенциальной инфекцией. Чтобы выжить в этой ситуации, он развил несколько механизмов для создания микробицидной среды в фагосомах и, таким образом, фагоцитоз стал средством получения питательных веществ и главным компонентом его защиты от инфекции. Аутофагия, путь перераспределения питательных веществ, также была включена в его защиту и активируется, когда микробы нарушают фагосому и/или выходят в цитозоль. Следовательно, *D. discoideum* является актуальной моделью для изучения роли клеточно-автономных защит в реакции клеток мононуклеарно-фагоцитарной системы на инфекцию.

Использование *D. discoideum* как модельного организма имеет много преимуществ. Культивирование этой амёбы не требует специальных факторов роста или цитокинов. Кроме того, *D. discoideum* реагируют на фагоцитоз и фагоцитарные микробы без необходимой предварительной активации. Таким образом, они являются более доступными для лабораторий с меньшим объемом финансовых ресурсов. Аналогичным образом, функции отдельных бактериальных факторов при инфекции могут быть более легко и тщательно оценены у *D. discoideum* благодаря своей податливости к многочисленным методам исследования.

Многие вопросы, касающиеся взаимодействия между внутриклеточными патогенами и

клетками мононуклеарно-фагоцитарной системы, остаются без ответа, и *D. discoideum* еще многому может нас научить. Понимание того, как *D. discoideum* воспринимает инфекцию, откроет новые возможности для изучения в клетках мононуклеарно-фагоцитарной системы.

### **Список литературы:**

1. Bonner J. The cellular slime molds. // Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 2nd edn. – 1967. – P. 204
2. Boulais J. et al. Molecular characterization of the evolution of phagosomes //Molecular systems biology. – 2010. – Т. 6. – №. 1.
3. Desjardins M., Houde M., Gagnon E. Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity //Immunological reviews. – 2005. – Т. 207. – №. 1. – С. 158-165.
4. Domínguez-Martín E. et al. Methods to monitor and quantify autophagy in the social amoeba *Dictyostelium discoideum* //Cells. – 2017. – Т. 6. – №. 3. – С. 18.
5. Gotthardt D. et al. High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases //Molecular biology of the cell. – 2002. – Т. 13. – №. 10. – С. 3508-3520.
6. Hybiske K., Stephens R. S. Exit strategies of intracellular pathogens //Nature Reviews Microbiology. – 2008. – Т. 6. – №. 2. – С. 99.
7. Mesquita A. et al. Autophagy in *Dictyostelium*: Mechanisms, regulation and disease in a simple biomedical model //Autophagy. – 2017. – Т. 13. – №. 1. – С. 24-40.
8. Otto G. P. et al. Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum* //Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Т. 278. – №. 20. – С. 17636-17645.
9. Tyler M. S. Developmental Biology: A guide for experimental study. // 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer. – 2000. – P. 31—34.
10. Zhang X., Soldati T. Of amoebae and men: extracellular DNA traps as an ancient cell-intrinsic defense mechanism //Frontiers in immunology. – 2016. – Т. 7. – С. 269.