

Российская академия наук
Учреждение Российской академии наук
Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра РАН

УДК 631.4 579.22
ВГК ОКП
№ госрегистрации 01201000022
Инв. № 0391-1

УТВЕРЖДАЮ
Директор Учреждения Российской
академии наук Казанского института
биохимии и биофизики Казанского
научного центра РАН, академик

_____ А.Н.Гречкин

“16” сентября 2011 г.

отчет
о научно исследовательской работе
в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры
инновационной России» на 2009-2013 годы по лоту «Проведение научных исследований
коллективами научно-образовательных центров в области технических наук»
по теме
«Секретируемые факторы токсигенности бактерий как перспективные средства контроля
патологических процессов»

Этап 5 (заключительный) «Разработка способов направленной регуляции биосинтеза и
токсических свойств микробных гидролаз и секретируемых метаболитов»

(мероприятие 1.1 Программы) шифр «2009-1.1-000-078-212» (госконтракт №
02.740.11.0391)

Государственный контракт от 30 сентября 2009 г № 02.740.11.0391

шифр заявки 2009-1.1-000-078-212

Руководитель темы
д-р биол. наук, проф.

_____ Чернов В.М.
подпись, дата

Казань 2011

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы,

д-р биол. наук

_____ В.М.Чернов
(все разделы)

Исполнители темы:

д-р. биол. наук

_____ А.О.Чернова
(разделы: введение,
1.3, 1.5)

д-р. биол. наук

_____ О.Н.Ильинская
(разделы: 1.2, 1.4,
заключение)

канд. биол. наук

_____ А.И.Колпаков
(раздел 1.2)

канд. биол. наук

_____ А.Б.Маргулис
(раздел 1.2)

канд. ф.-м. наук

_____ И.Ю.Петрушанко
(раздел 1.1)

канд. хим. наук

_____ В.А.Миткевич
(раздел 1.1)

инженер

_____ О.В.Симоненко
(раздел 1.1)

канд. биол. наук

_____ А.А.Музыкантов
(раздел 1.3)

канд. биол. наук

_____ Е.С.Медведева

(раздел 1.3)

канд. биол. наук

_____ П.В.Зеленихин
(раздел 1.2)

канд. биол. наук

_____ М.О.Зайнуллина
(раздел 1.2)

канд. биол. наук

_____ В.В.Ульянова
(раздел 1.2)

асп.

_____ А.А.Куликова
(раздел 1.1)

асп.

_____ И.Р.Ефимова
(раздел 1.3)

асп.

_____ Т.В.Федорова
(раздел 1.1)

Нормоконтролер

_____ Лapidус И.Ш.

Реферат

Отчет 78 с., 33 рис., 12 табл., 73 источников

Ключевые слова: бациллы рибонуклеазы, экспрессия протеиназ, цитотоксический потенциал, микоплазмы, токсигенные детерминанты

Данные по цитотоксическим свойствам микробных рибонуклеаз (РНказ), накопленные к настоящему времени и, в том числе, полученные в ходе выполнения настоящей НИР, показывают перспективность использования их в качестве противоопухолевых препаратов нового поколения. Протеомное профилирование бактериальных клеток, образующихся в стрессовых условиях, позволяет выявлять белки, участвующие в механизмах выживания микроорганизмов в неблагоприятных условиях [Renzzone et al., 2005; Cash, Argo, 2009]. Поиск соответствующих белков бактерий представляет значительный интерес как для выявления молекулярных основ адаптации микроорганизмов к стрессовым условиям, так и для разработки способов контроля патогенов [Coulhen et al., 2003].

Цель 5 этапа работы заключалась в разработке способов направленной регуляции биосинтеза и токсических свойств микробных гидролаз и секретируемых метаболитов.

Полученные результаты сформулированы следующим образом:

1. Проведены генно-инженерные направленные изменения молекулы биназы, позволившие усилить ее цитотоксические свойства.
2. Трансляция в гене *aprVi* начинается с нестандартного кодона GTG. Анализ геномов прокариот показал, что в генетическом аппарате бактерий, кроме классического стартового кодона ATG, в 10% и 12% открытых рамок считывания стартовыми кодонами являются GTG и TTG, соответственно.
3. Выявлены молекулярно-генетические отличия токсигенных и нетоксигенных штаммов микоплазм, связанные с особенностями морфометрических параметров ДНК клеток бактерий, профиля растворимых белков, модуляции экспрессии факторов вирулентности и секреции нановезикулярных структур, которые помимо мембранных содержат цитоплазматические белки, а также гены, и проявляют высокую мутагенность в отношении клеток эукариот.
4. Выраженная мультифункциональность белков микоплазм, динамичность их протеомов, ассоциирующая с количественными и качественными изменениями экспрессии генов, а также образованием белковых ассоциатов и их взаимоотношений – интерактомов, могут определять разнообразные перестройки клеток и молекулярной биологии микоплазмы, обеспечивающие образование некультивируемых форм.

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	6
Введение	7
1. Результаты и их обсуждение.....	10
1.1. Проведение генно-инженерных направленных изменений молекулярных характеристик РНКаз для усиления их цитотоксического потенциала.....	10
1.2. Оптимизация сайтов взаимодействия с позитивными белками-регуляторами в промоторной области генов для эффективной экспрессии протеиназ.....	17
1.3. Выявление молекулярно-генетических отличий штаммов микоплазм, продуцирующих токсические метаболиты, от нетоксигенных штаммов, и характеристика условий усиления/ослабления токсигенных детерминант	27
1.4. Разработка программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс.....	42
1.5. Протеомный анализ вегетативных и некультивируемых форм микоплазм	43
Заключение.....	67
Список использованных источников.....	73

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2 ДЕ	–	двумерный гель-электрофорез
а.о.	–	аминокислотный остаток
АСМ		атомно-силовая микроскопия
АТФ	–	аденозинтрифосфат
АФК	–	активные формы кислорода
ВФ	–	вегетативные формы
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
КОЕ	–	колониеобразующие единицы
М	–	моль
МДа	–	мегадальтон
мкМ	–	микромоль
мкм	–	микрометр
мл	–	миллилитр
мРНК	–	матричная рибонуклеиновая кислота
МС	–	масс-спектрометрия
нм	–	нанометр
н.п.о.	–	нуклеотидная пара оснований
НУ	–	неблагоприятные условия
НУС	–	неблагоприятные условия среды
НФ	–	некультивируемые формы
ОРС	–	открытая рамка считывания
ППСЭ	–	полноценная питательная среда Эдварда
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
рРНК	–	рибосомная рибонуклеиновая кислота
РУС	–	разные условия среды
тРНК	–	транспортная рибонуклеиновая кислота
тыс.п.н.о.	–	тысяч пар нуклеотидных оснований
УМФ	–	ультрамикроформы
ЦПМ	–	цитоплазматическая мембрана
ЭДТА	–	этилендиаминтетраацетат
DIGE	–	дифференциальный гель-электрофорез (d ifference g el e lectrophoresis)
F	–	прямой праймер (f orward)
PNP	–	полирибонуклеотиднуклеотидилтрансфераза (p olyribonucleotide n ucleotidyl p hosphorylase)
R	–	обратный праймер (r everse)

ВВЕДЕНИЕ

Данные по цитотоксическим свойствам микробных рибонуклеаз (РНКаз), накопленные к настоящему времени и, в том числе, полученные в ходе выполнения настоящей НИР, показывают перспективность использования их в качестве противоопухолевых препаратов нового поколения. Ранее нами были получены результаты по расшифровке элементов механизма цитотоксичности микробных рибонуклеаз [Mitkevich et al., 2010; 2010; Pinskaya et al., 2007; 2008] и были охарактеризованы ключевые молекулярные детерминанты рибонуклеаз, важные для цитотоксичности [Makarov, Pinskaya, 2003; Makarov et al., 2008]. На предыдущих этапах работы мы охарактеризовали действие РНКазы из *Bacillus intermedius* (биназы) на клетки, экспрессирующие активированные онкогены KIT и *AML1-ETO*, характерные для острого миелогенного лейкоза (ОМЛ) [Wang et al., 2005]. Также был оценен вклад экспрессии онкогенов *c-kit* и *AML1-ETO* в селективность действия биназы по отношению к линиям клеток трансформированных этими онкогенами по отдельности и вместе, а также на перевиваемые клетки ОМЛ человека Касуми-1. Кроме того, были определены условия биосинтеза потенциально токсичных для эукариотических клеток рибонуклеаз и протеиназ и выявлена роль деградации основных субстратов микробных протеиназ и РНКаз (соответственно белки, РНК) в процессе индуцированной микробными гидролазами гибели эукариотических клеток.

Исследование генотоксичности и нефротоксичности РНКаз показало, что эти свойства присущи только каталитически активным формам ферментов. Полученные нами ранее данные по пространственной структуре биназы свидетельствуют о том, что белок в кристалле находится в виде димера. Димерная организация белка наблюдается как в структуре свободного фермента, так и в структурах комплексов свободного фермента с субстратом и сульфат ионами [Polyakov et al., 2002], а также в структуре мутанта биназы (W34F). При этом димерная структура организована таким образом, что только одна из двух молекул фермента может связать субстрат. При этом активный центр второй молекулы оказывается заблокирован. Поскольку димерная структура была обнаружена нами в кристаллах, выросших при четырех различных условиях, это позволяет предположить возможность образования подобной структуры и в растворе. Было предложено, что модификация фермента, направленная на разрушение димерной структуры приведет к увеличению эффективной концентрации фермента и, соответственно цитотоксичности. С этой целью, в соответствии с техническим заданием и календарным планом, на настоящем этапе НИР были проведены генно-инженерные направленные изменения молекулярных характеристик биназы для усиления ее цитотоксического потенциала. Были получены три

мутанта биназы с заменами в области димерного контакта и исследованы их физикохимические и цитотоксические свойства.

Протеолитические ферменты составляют группу стратегических белков, жизненно важных для функционирования клеток бактерий. Кроме трофической функции они участвуют в клеточной дифференцировке, в посттрансляционном процессинге белков и других регуляторных процессах. Хорошо изучен класс сериновых протеаз, к которому относится семейство субтилизиноподобных протеиназ, синтезируемых многими видами бацилл [Siezen et al., 1997]. Первым из культуральной жидкости *B. subtilis* был выделен и детально изучен субтилизин E, кодируемый геном *aprE* [Ferrari et al., 1988]. Позднее показано, что подобные ферменты синтезируются многими видами бацилл [Siezen et al., 1997]. В настоящее время описаны более 200 субтилизиноподобных протеиназ, гены большинства из них клонированы и секвенированы. С помощью кристаллографии установлены трехмерные структуры многих из этих белков [Takeuchi et al., 1991]. Тем не менее, сведения о регуляции экспрессии генов этих ферментов малочисленны.

Из культуральной жидкости *B. intermedius* выделена субтилизиноподобная сериновая протеиназа [Балабан с соавт., 1993]. Фермент появляется в среде в фазе замедления роста («ранний» фермент) и достигает максимального уровня в стационарной фазе («поздний» фермент) [Шарипова с соавт., 2002]. Ген протеиназы (*aprBi*) клонирован и установлена его нуклеотидная последовательность [Sharipova et al., 2008]. Сравнительный анализ показал, что кодирующая область гена *aprBi* имеет высокую структурную гомологию (96% идентичности) с геном субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* [Aoyama et al., 2000], гомология с геном другой протеиназы этого класса – субтилизином E [Ferrari et al., 1988] составляет 76%. При этом регуляторные области генов-функциональных гомологов имеют низкую гомологию, что может отражать отличие в регуляции экспрессии соответствующих генов. В последовательности гена *aprBi* отсутствует выраженная последовательность Шайна-Дельгарно, ответственная за связывание матричной РНК с рибосомой и инициацию трансляции [Rocha et al., 1999]. Это затрудняет идентификацию стартового кодона, необходимого для клонирования промоторной области гена. Цель исследования – установить точку инициации трансляции в последовательности гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*.

Микоплазменные инфекции человека представляют собой серьезную проблему, для решения которой необходима разработка особой стратегии. Полная элиминация микоплазм из макроорганизма практически невозможна, поэтому нами начата реализация принципиально нового подхода, основанного на нейтрализации токсигенного потенциала этих внутриклеточных паразитов индуцированным переходом их в физиологическое

состояние, характеризующееся снижением продукции токсических метаболитов. Для направленной регуляции токсигенности микоплазм необходимо определить спектр последних и установить их особо опасные геном-повреждающие эффекты. В мировой литературе нет сведений по данному вопросу.

Широкое распространение микоплазм предполагает успешную адаптацию этих бактерий к стрессовым условиям, связанным с изменением температуры, истощением питательных веществ и источников энергии, воздействием АФК и некоторым другим. Протеомное профилирование бактериальных клеток, образующихся в стрессовых условиях, позволяет выявлять белки, участвующие в механизмах выживания микроорганизмов в неблагоприятных условиях [Renzone et al., 2005; Cash, Argo, 2009]. Поиск соответствующих белков бактерий представляет значительный интерес как для выявления молекулярных основ адаптации микроорганизмов к стрессовым условиям, так и для разработки способов контроля патогенов [Coulhen et al., 2003]. Однако в отношении исследований стресс-реактивных белков микоплазмы сделаны лишь первые шаги [Чернов и др., 2004]. Одной из задач данного этапа работы явился протеомный анализ клеток микоплазм (*A. laidlawii* PG8, *M. gallisepticum*, *M. hominis*) подвергнутых длительному воздействию неблагоприятных факторов, в результате решения которой впервые идентифицированы белки, вовлеченные в адаптацию бактерии к соответствующим стрессовым условиям.

Цель 5 этапа работы заключалась в разработке способов направленной регуляции биосинтеза и токсических свойств микробных гидролаз и секретируемых метаболитов..

В результате реализации 5 этапа государственного контракта: 1) проведены генно-инженерные направленные изменения молекулярных характеристик РНКаз для усиления их цитотоксического потенциала; 2) оптимизированы сайты взаимодействия с позитивными белками регуляторами в промоторной области генов для эффективной экспрессии протеиназ; 3) выявлены молекулярно-генетические отличия штаммов микоплазм, продуцирующих токсические метаболиты, от нетоксигенных штаммов, и охарактеризованы условия усиления/ослабления токсигенных детерминант; 4) разработана программа внедрения результатов НИР в образовательный процесс, а также 5) выполнен протеомный анализ вегетативных и некультивируемых форм микоплазм.

1. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1.1. Проведение генно-инженерных направленных изменений молекулярных характеристик РНКаз для усиления их цитотоксического потенциала

В работе использовали биназу – гуанилспецифичную РНКазу *Bacillus intermedius* 7P дикого типа (молекулярная масса 12.3 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI=9.5) [Shulga et al., 1998]. Каталитическая активность биназы охарактеризована ранее по отношению к синтетическим субстратам [Yakovlev et al., 1987] и высокополимерной дрожжевой РНК [Yakovlev et al., 1994].

Введение мутаций в ген биназы. Единичные мутации Q43A и F81A в ген биназы вводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Двойную мутацию Q43A,F81A вводили последовательно в 2 этапа при помощи стандартной процедуры, каждый этап состоял из двух последовательных ПЦР. На первой стадии каждого этапа в отдельных реакциях ПЦР нарабатывали фрагменты гена, располагающиеся по обе стороны от места введения мутации. Для этого использовали два взаимнокомплементарных мутагенных праймера QAdir и QArev на первом этапе и FAdir, FArev на втором, а также вспомогательные праймеры 1732-19pr и SP6, имеющие места посадки на 5'- и 3'-концах экспрессионной кассеты, соответственно. В одну из реакций добавляли пару праймеров QAdir и SP6, в другую – праймеры QArev и 1732-19pr. Матрицей служила плазмидная ДНК экспрессионного вектора pPBi. ПЦР продукты фракционировали при помощи электрофореза в агарозном геле и фрагменты ДНК необходимой длины выделяли из геля при помощи набора MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). Далее осуществляли рекомбинацию двух фрагментов по перекрывающимся областям при помощи ПЦР с праймеров 1732-19pr и SP6. Фрагмент ДНК, содержащий ген биназы с мутацией, очищали при помощи набора реактивов MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) и расщепляли при помощи рестриктаз BamHI и HindIII. Продукты гидролиза разделяли при помощи электрофореза в агарозном геле. Фрагмент ДНК требуемой длины выделяли из агарозы при помощи набора реактивов MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) и клонировали в плазмиду pPBa по сайтам BamHI и HindIII. Плазмида pPBa аналогична pPBi, но предназначена для экспрессии родственной РНКазы барназы. Плазмидную ДНК нескольких клонов анализировали при помощи рестрикции. В дальнейшую работу брали только те клоны, которые по результатам рестрикции содержали ген биназы. Наличие желаемых мутаций в гене биназы подтверждали при помощи секвенирования ДНК с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-

Avant. Для надежности последовательность ДНК определяли по двум цепям, используя праймеры 1732-19pr и SP6.

Культивирование штаммов-продуцентов биназы и её мутантов.

Культивирование штаммов-продуцентов осуществляли в лабораторном ферментёре Biostat B-2 (Sartorius BBI, Germany) общим объёмом 2,5 л. Для приготовления посевного материала в колбу на 300 мл вносили 40 мл среды YT (бакто-триптон - 8 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, NaCl 5 г/л) и добавляли ампициллин до концентрации 300 мкг/мл. Затем размораживали 100 мкл суспензии клеток глицеринового стока штамма-продуцента при 4°C и вносили в колбу со средой. Выращивали посевной материал на качалке при 28°C и 250 об/мин в течение ночи. Культивирование в ферментёре осуществляли на среде ТВ (бакто-триптон - 12 г/л, дрожжевой экстракт - 24 г/л, глицерин - 5 г/л, KH_2PO_4 - 2.31 г/л, K_2HPO_4 - 12.54 г/л) с ампициллином 300 мкг/мл в объёме 1.7 л. По ходу культивирования поддерживали следующие параметры: температура 28°C до индукции и 37°C после; подача воздуха 2 л/мин; концентрация растворенного кислорода (pO_2) \geq 30 % от насыщения; перемешивание регулируется блоком управления по данным pO_2 (500-1000 об/мин). Индукцию синтеза рекомбинантного белка осуществляли при оптической плотности 1.5-2.0 ед. путём повышения температуры среды до 37°C, после чего культивирование продолжали ещё 20 часов. По окончании культивирования культуральную жидкость центрифугировали на центрифуге Jouan BR 4i в пробирках на 50 мл при 9000 g и 4°C 10 мин. Супернатант собирали в отдельную ёмкость и использовали для выделения белка.

Очистка и выделение мутантов биназы. Супернатант, полученный после культивирования штаммов-продуцентов, подкисляли ледяной уксусной кислотой до pH 4.5, перемешивали в течение 60 мин при 4°C и центрифугировали в тех же условиях, что и ранее. Полученный супернатант разбавляли в пять раз водой Milli-Q и наносили на фосфоцеллюлозу (Sigma). После отмывки колонки белок элюировали 50 mM NaPi, 1.7 M NH_4Cl , pH 7.0. Элюат концентрировали на устройстве Amicon Ultra-15 с MWCO 3000 (Millipore). К концентрату добавляли 3.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в пропорции 2:1 и наносили на Phenyl Sepharose FF (Amersham Biosciences). Белок с колонки снимали понижающимся градиентом $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от 1.7 до 0 M и переводили в 20 mM NaOAc, pH 4.5 при помощи диализа. В дальнейшем разделение белков проводили на колонке MonoS HR 10/100 (Amersham Biosciences) по стандартной методике. Полученные фракции анализировали при помощи гель-электрофореза по Лэмли. Фракции, содержащие ПМБ объединяли и концентрировали на устройстве Concentrator 5301 (Eppendorf) [Pinskaya et al., 2007]. Белковый раствор наносили на колонку с Sephadex G50 (10 x 900 мм), уравновешенную 10

mM NH_4HCO_3 и 1 mM EDTA. Хроматографию проводили при скорости потока – 0.1 мл/мин. Полученные фракции анализировали при помощи гель-электрофореза по Лэмбли. Фракции, содержащие РНКазу объединяли и лиофилизовали.

Измерение кинетических параметров реакции гидролиза poly(I) биназой и ее мутантами. Измерения проводили при 25°C в 0,1 М цитратном буфере pH 6.2. Начальные скорости реакции гидролиза poly(I) определяли спектрофотометрически на спектрофотометре V-560 (“Jasco” Япония) по изменению поглощения раствора на 248 нм, используя разностный молярный коэффициент поглощения $\epsilon = 1330 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Величины k_{cat} и K_M определяли из графиков зависимости скорости реакции гидролиза от концентрации субстрата методом нелинейной регрессии, используя уравнение Михаэлиса-Ментен. Ошибка в определении параметров k_{cat} и K_M не превышала 12%.

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически, принимая молярный коэффициент экстинкции при 280 нм для равным $27411 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Концентрации poly(I) измеряли, используя значение $\epsilon_{248} = 10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при pH 7.8.

Определение параметров тепловой денатурации методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Эксперименты проводили на микрокалориметре VP-DSC (MicroCal, США) при скорости нагрева 1 К/мин в 10 mM Na-ацетатном буфере, содержащем 50 mM NaCl, pH 6,2. Концентрация белков составляла 0,5 мг/мл. Обратимость процесса тепловой денатурации определяли как отношение теплоты денатурации белка при повторном нагреве после охлаждения к её значению при первом нагреве. Параметры тепловой денатурации белка T_d , $\Delta H_{\text{кал}}$ и $\Delta H_{\text{эфф}}$ (температура денатурации, калориметрическая и эффективная энтальпия денатурации) определяли как было описано ранее [Mitkevich et al., 2003]. Точность определения величин калориметрической и эффективной энтальпий составляла 2-6%. Экспериментальная ошибка измерения T_d не превышала $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Кривые тепловой денатурации были проанализированы с помощью пакета программ Origin-DSC.

Определение выживаемости клеток под действием рибонуклеаз. Была использована перевиваемая линия клеток острого миелогенного лейкоза Касуми-1, полученная из Heinrich-Pette Institute *Leibniz Institute for Experimental Virology* (Гамбург, Германия). Клетки выращивали на среде RPMI-1640, содержащей 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, 100 ед./мл пеницилина, 100 мкг/мл стрептомицина и 1 mM пирувата Na при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Выживаемость клеток оценивали с помощью теста WST-1 (Roche Diagnostics, Швейцария). Клетки высевали на 96-луночные планшеты по 3×10^4 кл./лун. за сутки до обработки ферментом. Выживаемость клеток определяли через 72 часа после добавления фермента. Клетки

инкубировали 60 мин. с реагентом WST-1 при 37°C. Затем поглощение образцов измеряли с помощью микрпланшетного ридера Anthos 2020 (Anthos Labtech Instruments GmbH) на длине волны 450 нм. Для сравнения использовали длину волны 620 нм. В качестве контроля использовали смесь среды без клеток с реагентом WST-1. Выживаемость клеток, не обработанных ферментом, принимали за 100%.

Анализ кристаллической структуры биназы и ее W34F мутанта (Рис. 1) показал, что фермент в кристалле находится в виде димера. Образование подобных димерных структур в растворе может приводить к уменьшению эффективной концентрации фермента и, как следствие, снижению каталитической активности. Это в свою очередь может приводить к уменьшению цитотоксических эффектов биназы.

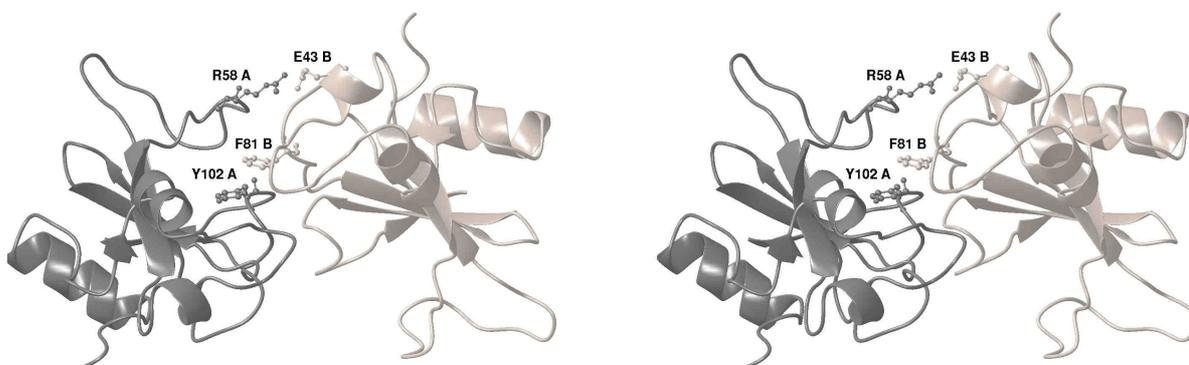


Рис. 1. Структура димера, сформированного двумя кристаллографически независимыми молекулами мутантной формы W34F биназы. Показано положение боковых цепей остатков, вносящих определяющий вклад во взаимодействие молекул (Тур 102 и Arg 58 молекула А, Glu43 и Phe 81 молекула В).

В димере активный центр одной из молекул заблокирован, т.к. боковая цепь остатка Phe81 второй молекулы димера образует стекнинг взаимодействие с боковой цепью каталитического остатка Тур102 первой молекулы димера и частично перекрывает область связывания гуанилового основания первой молекулы, а боковая цепь остатка Arg58 первой молекулы, которая в структуре комплекса биназы с субстратом образует стекнинг взаимодействие с гуаниловым основанием, развернута в сторону от активного центра и образует солевой мостик с боковой цепью остатка Glu 43 второй молекулы. Замены аминокислот в биназе в области димерного контакта (двойные мутанты: Q43D,F81A и Q43A,F81A) не затрагивают активный цент фермента. Следует ожидать, что такие мутантные формы белка потеряют способность к образованию димеров в растворе, что приведет к возрастанию их ферментативной активности по сравнению с ферментом

дикого типа за счет разрушения димерной структуры, в которой обнаружено самоингибирование. Поэтому, с целью предотвратить димеризацию биназы, мы заменили остатки 81 и 43 по отдельности и вместе на аланин.

Данные по гидролизу модельного субстрата poly(I) биназой и ее мутантами с заменами Glu43Ala и Phe81Ala представлены в Таблице 1. Одиночная замена остатка Glu43 и Phe81 мало влияет на кинетические параметры гидролиза ферментом. Замена остатка Phe81 приводит к увеличению константы скорости реакции гидролиза (k_{cat}) на 20%, при этом константа Михаэлиса не меняется. Эффективность гидролиза (k_{cat}/K_M) poly(I) двойным мутантом биназы Glu43Ala/Phe81Ala почти на 60% выше, чем у нативной биназы (Таблица 1). При этом сродство к субстрату у обоих ферментов близко, и повышение эффективности достигается за счет увеличения k_{cat} . Это, скорее всего, обусловлено увеличением эффективной концентрации белка за счет отсутствия димерных форм, в которых происходит самоингибирование фермента. Нельзя, однако, исключить, что замены в белке привели к увеличению скорости гидролиза субстрата.

Таблица 1.

Кинетические параметры, характеризующие гидролиз poly(I) биназой и ее мутантами

РНКаза	k_{cat} (с ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ с ⁻¹)
биназа	188	77	2441558
Q43A	205	77	2662337
F81A	231	75	3080000
Q43A/ F81A	286	70	4085714

Для того, чтобы выяснить, не претерпели ли молекулы мутантов биназы серьезных структурных нарушений в результате замен аминокислотных остатков, были измерены термодинамические параметры плавления этих белков с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии. В качестве примера на рисунке 2 представлена кривая плавления Glu43Ala/Phe81Ala мутанта биназы. Результаты измерений представлены в Таблице 2. Видно, что одиночные мутанты биназы практически не отличаются по параметрам плавления от нативного фермента. В тоже время двойной мутант имеет температуру плавления на 4,6° ниже исходного фермента. Это может свидетельствовать о том, что связи, удерживающие две молекулы биназы друг с другом стабилизировали белок, а плавление мономерной молекулы белка ниже, чем димерной. С другой стороны, нельзя исключить, что введение мутаций повлияло на стабильность мономерной молекулы. Однако, поскольку параметры плавления одиночных

мутантов практически не отличаются от параметров плавления биназы, можно полагать, что сами по себе замены не влияют на стабильность структуры белка.

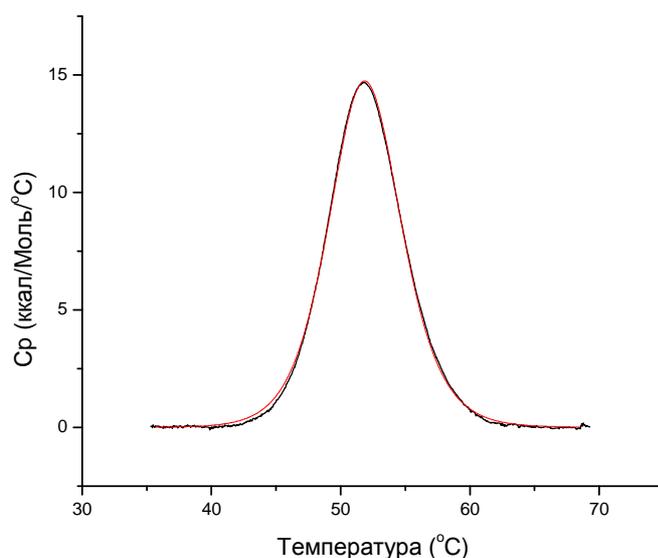


Рис. 2. Зависимость избыточной молярной теплоемкости от температуры для Glu43Ala/Phe81Ala мутанта биназы.

Таблица 2.

Термодинамические параметры плавления биназы и ее мутантов

РНКаза	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{\text{кал}}$ ккал/моль	$\Delta H_{\text{эфф}}$ ккал/моль
биназа	56,5	124	126
Q43A	56,1	125	123
F81A	55,4	120	120
Q43A/ F81A	51,9	110	113

Для исследования цитотоксичности мутантов биназы была выбрана линия клеток острого миелогенного лейкоза человека Касуми-1 в отношении которой, как было показано на предыдущих этапах работы, биназа проявляет повышенную цитотоксичность. На рисунке 3 представлены кривые зависимости выживаемости клеток Касуми-1 от концентрации биназы, которой они были обработаны в течение 72 ч. Результаты расчетов коэффициентов выживаемости IC_{50} (концентрации фермента, при которой выживает половина клеток) представлены в таблице 3. Можно видеть, что одиночные мутанты биназы проявляют цитотоксичность сходную с нативным белком. Значение IC_{50} для двойного мутанта биназы по отношению к клеткам Касуми-1 на 23% ниже, чем для самой

биназы (Таблица 3). Повышенная цитотоксичность этой мутантной формой биназы коррелирует с повышенной эффективностью катализа (Таблица 1). Меньший рост цитотоксичности мутанта по сравнению с каталитической активностью может быть связан с тем, что белок, потерявший способность к димеризации, более подвержен действию внутриклеточных протеаз. Последнее может также обуславливаться и тем, что мутант биназы имеет пониженную, по сравнению с нативным белком, термостабильность (Таблица 2). Надо заметить, что в отношении рибонуклеаз было показано, что димеризация фермента может приводить к увеличению степени цитотоксичности последнего именно за счет того, что фермент становится более устойчив к действию внутриклеточных факторов.

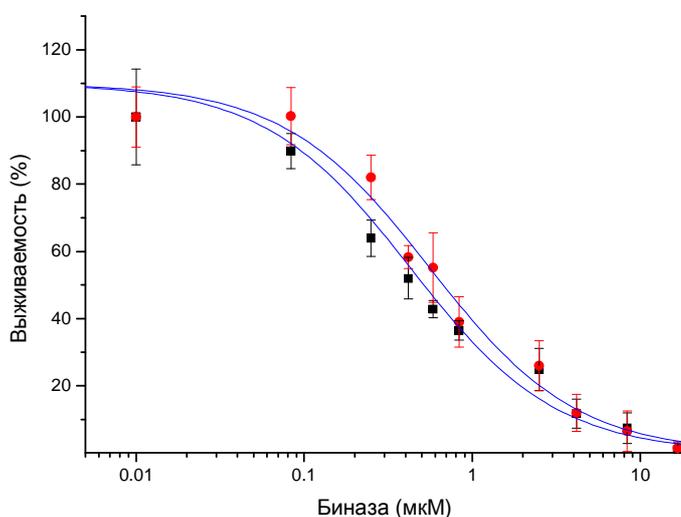


Рис. 3. Зависимость выживаемости клеток Касуми-1 от концентрации биназы (красные кружки) и ее Q43A/ F81A мутанта (черные квадраты) через 72 ч. после обработки ферментом.

Таблица 3.

Значение коэффициента IC_{50} , характеризующее цитотоксичность белка, для биназы и ее мутантов

РНКаза	IC_{50} , мкМ
биназа	0,56
Q43A	0,55
F81A	0,51
Q43A/ F81A	0,43

Резюмируя полученные на заключительном этапе НИР результаты можно считать, что сделанные генно-инженерные направленные изменения молекулы биназы привели к усилению ее цитотоксических свойств. Работы выполнены в полном соответствии с техническим заданием и календарным планом.

1.2. Оптимизация сайтов взаимодействия с позитивными белками-регуляторами в промоторной области генов для эффективной экспрессии протеиназ

Протеолитические ферменты или протеазы – ферменты, которые относятся к классу гидролаз, катализирующие гидролиз пептидных связей в белках. Протеазы классифицируют на основе двух параметров: специфичности и структуре каталитического центра. Пептидогидролазы делят на: пептидазы (экзопептидазы), которые гидролизуют пептидные связи на концах полипептида, и протеиназы (эндопептидазы), расщепляющие пептидные связи внутри молекулы белка. По строению активного центра и механизму катализа все эндопептидазы подразделяются на четыре основные группы: сериновые, цистеиновые, аспартатные и металлопротеазы.

Бациллы синтезируют в среду различные внеклеточные ферменты, среди которых наиболее изученными являются субтилизиноподобные протеиназы, которые относятся к группе сериновых протеиназ (субтилаз) [Siezen et al., 1997; Barrett et al., 1995]. Впервые из культуральной жидкости *Bacillus subtilis* выделили и детально охарактеризовали субтилизин Е, кодируемый геном *aprE*. Позднее было показано, что подобные ферменты синтезируются многими видами бацилл. На сегодняшний день субтилизины найдены в различных организмах: археях, вирусах, бактериях, грибах, высших эукариотах. Несмотря на значительную филогенетическую отдаленность этих организмов, обнаружено немалое сходство в строении и функциях сериновых протеиназ, что позволяет сделать вывод об эволюционном родстве этих ферментов. В настоящее время имеются данные более чем о 200 ферментах этой группы протеиназ. Установлены последовательности генов для многих бактериальных субтилаз, детально изучены свойства этих ферментов и для некоторых белков установлена пространственная структура [Балабан с соавт., 2007].

Большинство субтилизиноподобных протеиназ – внеклеточные белки, но имеются также и внутриклеточные ферменты. Субтилизины являются секреторными ферментами с молекулярной массой около 28-32 кДа. Они гидролизуют связи, образованные гидрофобными аминокислотами, и активны по отношению к специфическим хромогенным субстратам. Сериновые протеиназы имеют в составе каталитической триады активного центра аспарагиновую кислоту, гистидин и серин [Siezen et al., 1997].

Аминокислоты в составе активного центра обуславливают специфичность фермента и, связываясь с субстратом, участвуют в изменении его конформации и гидролизе.

Субтилизиноподобные протеиназы синтезируются в виде предшественника с пре- и пропоследовательностями с N-конца зрелого белка [Bryan et al., 1995]. Препоследовательность состоит из 28-30 аминокислотных остатков и выполняет функцию сигнального пептида во время транслокации через цитоплазматическую мембрану. Пропоследовательность включает 77 и более аминокислот и выполняет роль шаперона, который обеспечивает правильное сворачивание белковой глобулы в третичную структуру, либо является ингибитором протеолитической активности фермента [Shinde et al., 1997; Yabuta et al., 2001]. Отличительной особенностью субтилизиноподобных ферментов является отсутствие остатков цистеина в аминокислотной последовательности и, как следствие, дисульфидных связей в молекуле зрелого белка.

Кроме бацилл, субтилизиноподобные протеиназы выделены из многих микроорганизмов, описаны их физико-химические и каталитические свойства. Ферменты активны в щелочной области pH (9-11), имеют температурный оптимум 45-60°C. При температуре выше 65°C, как правило, наступает необратимая денатурация белка. Однако механизмы регуляции экспрессии их генов остаются малоизученными. Среди бациллярных ферментов этого семейства наиболее детально изучена регуляция субтилизина *B.subtilis*.

Протеиназы продуцируются бациллами в период как роста культуры, так и споруляции. Исследования биосинтеза фермента показали, что на долю субтилизиноподобной протеиназы приходится около 70% от общего пула протеиназ, секретируемых *B.intermedius* в постэкспоненциальную фазу роста [Шарипова с соавт., 2002]. Из культуральной жидкости *B.intermedius* была выделена сериновая протеиназа AprVi, продукт гена *aprVi*, активно расщепляющая казеин, азоказеин и синтетический субстрат Z-Ala-Ala-Leu-pNa, специфичный для субтилизиноподобных протеиназ [Балабан с соавт., 1993, 1994]. Фермент оказался стабильным в диапазоне pH 6,3-11, с оптимумом pH 11 при гидролизе казеина и проявлял максимум активности при 50°C [Балабан с соавт., 1993]. Было установлено, что протеиназа предпочтительно расщепляет белки по гидрофобным аминокислотам, присутствие ионов Ca²⁺ стабилизирует молекулу фермента и повышает его активность [Ицкович с соавт., 1997].

Максимальное накопление фермента происходит на 24-й и 44-46-й ч роста, что соответствует стадиям инициации споруляции и освобождению зрелых эндоспор [Шарипова с соавт., 2002]. Установлено, что как ранняя так и поздняя протеиназа являются продуктами одного гена, но различаются по механизмам регуляции биосинтеза

[Кириллова с соавт., 2006]. Ген протеиназы *AprVi* клонирован и установлена его нуклеотидная последовательность [Sharipova et al., 2008]. Кодированный участок гена характеризуется значительной степенью сходства с геном субтилизиноподобной протеиназы *B.pumilus* (96% идентичности), и 76% - с геном другой протеиназы субтилизином E [Aoyama et al., 2000]. Экспрессия генов протеиназ контролируется сложной регуляторной системой включающей такие регуляторные белки, как Spo0, AbrB, CspA, DegU, SinR, Hpr и др.

Анализ области регуляции гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* позволил выявить участки с гомологией для специфического взаимодействия с регуляторными белками DegU, Spo0A, AbrB и CspA [Sharipova et al., 2008]. Показано участие в позитивной регуляции экспрессии гена *aprVi* со стороны двухкомпонентной системы трансдукции сигнала DegS-DegU, регулирующей экспрессию генов ферментов деградации и белка Spo0A, регулирующего инициацию спорообразования [Sharipova et al., 2008]. На биосинтез протеиназы также оказывают влияние белок углеродной катаболитной репрессии CspA и белок AbrB, контролирующей экспрессию генов, связанных с периодом окончания вегетативного роста и началом спорообразования [Sharipova et al., 2008].

Показано влияние различных компонентов питательной среды на образование субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*. Сложные органические субстраты – альбумин, казеин, гемоглобин и желатин – оказывают репрессирующее действие на биосинтез фермента. Наиболее выраженное подавляющее действие на биосинтез оказывают гидрофильные аминокислоты – глутамин и глутаминовая кислота, что, по-видимому связано с регуляцией синтеза фермента по типу репрессии конечным продуктом [Маликова с соавт., 2007]. Выявлен стимулирующий эффект на продукцию фермента ряда аминокислот (в концентрациях 0.05 и 0.1 мг/мл), а также казаминовых кислот в концентрации до 2 мг/мл [Кириллова с соавт., 2006]. Установлено положительное влияние на биосинтез фермента поздней стационарной фазы ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} [Кириллова с соавт., 2006]. Присутствие в среде глюкозы приводит к снижению уровня продукции внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы в переходный период от вегетативного роста к спорогенезу и не подавляет биосинтез субтилизиноподобной протеиназы рекомбинатного штамма *B. subtilis* на поздних этапах цикла развития [Кириллова с соавт., 2006].

Таким образом, субтилизиноподобная протеиназа *B.intermedius* относится к ферментам второй фазы роста, синтез которых осуществляется в фазу замедления роста и при переходе культуры в стационарную фазу. Различия закономерностей биосинтеза

обеих субтилизиноподобных протеиназ *B.intermedius* позволяют предположить, что в стационарной фазе роста происходит переключение систем контроля экспрессии гена фермента.

При переходе в стационарную фазу роста у бацилл активируется экспрессия многих генов, направленных на формирование адаптивного ответа клетки для продолжения роста в неблагоприятных условиях. Регуляция экспрессии генов осуществляется различными регуляторными белками. Эти регуляторные системы воспринимают сигналы окружающей среды и, взаимодействуя с определенными последовательностями в промоторной области ряда генов, подавляют или активируют их транскрипцию. Экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы AprVi подвержена контролю со стороны многих регуляторных механизмов, в том числе и таких факторов транскрипции как DegU, Spo0A, AbrB и CsrA.

В работе использовали штаммы и плазмиды, перечисленные в таблице 4. Штаммом-реципиентом для плазмид с геном субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius* служил лабораторный штамм *Bacillus subtilis* AJ73, дефектный по собственным внеклеточным протеиназам. Ген протеиназы AprVi клонирован на плазмиде pCS9 [Sharipova et al., 2008], производной вектора pCB22 [Sorokin, Khazak, 1990]. Используя плазмиды pCS9 и pCB22, мы сконструировали плазмиды pKA, pKT, pKG, pKTG, которые содержат модифицированные гены субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* с мутациями в одном из потенциальных стартовых кодонов.

Культивирование штаммов *B. subtilis* проводили на среде LB [Sambrook et al., 1989] при температуре 37°C в колбах объемом 100 мл на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об/мин. В качестве инокулята использовали 18 ч культуру, выращенную на среде LB.

Определение протеолитической активности проводили по методу, описанному ранее в работе [Ицкович с соавт., 1997]. В качестве субстрата использовали синтетический хромогенный олигопептид Z-Ala-Ala-Leu-pNA. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизовало 1 нмоль субстрата за 1 мин.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с помощью термоциклера «Герцик» производства фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием Pfu-ДНК-полимеразы фирмы «Сибэнзим» (Россия). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 0.03 – 0.04 мкг плазмидной ДНК, 10 пикамоль каждого праймера, 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM KCl, 10 mM

(NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100 и 2.0 ед. Pfu-полимеразы («Сибэнзим»). Режим ПЦР: денатурация ДНК при 94°C в течение 4 мин, затем: 94°C – 40 с, отжиг олигонуклеотидов – 1 мин, 72°C – время из расчета 500 нуклеотидов в мин, всего – 25 циклов, с заключительным синтезом при 72°C в течение 7 мин. При проведении ПЦР с использованием мегапраймера время отжига праймеров увеличивали до 2 мин. Рестрикцию ДНК проводили рестриктазами фирмы «Сибэнзим» в условиях, рекомендованных производителем. Лигирование ДНК проводили при температуре 4⁰С в течение ночи лигазой фага Т4 («Сибэнзим»). Трансформацию протопластов *B. subtilis* плазмидной ДНК проводили как описано [Chang et al., 1979].

Мутагенез гена субтилизиноподобной протеиназы AprBi *B.intermedius*. Мутации в ген *aprBi* вводились методом олигонуклеотид направленного мутагенеза (рисунок 4).

Таблица 4

Плазмиды, полученные в работе

Штамм или плазида	Характеристика	Источник
<i>B. subtilis</i> AJ73	Штаммы Лабораторный штамм, дефицитный по внеклеточным протеазам	ЛБИ ИМГ РАН
pCS9	Плазмиды Em ^r , полноценный ген <i>aprBi</i> .	[Sharipova et al., 2008]
pKA	Em ^r , ген <i>aprBi</i> с заменой ATG → CTA (met → leu) (рисунок 3)	Данная работа
pKG	Em ^r , ген <i>aprBi</i> с заменой GTG → GCT (val → ala) (рисунок 3)	Данная работа
pKT	Em ^r , ген <i>aprBi</i> с заменой TTG → TCC (leu → ser) (рисунок 3)	Данная работа
pKTG	Em ^r , ген <i>aprBi</i> с заменой GTG → GCT, TTG → TCC (val → ala, leu → ser) (рисунок 3)	Данная работа

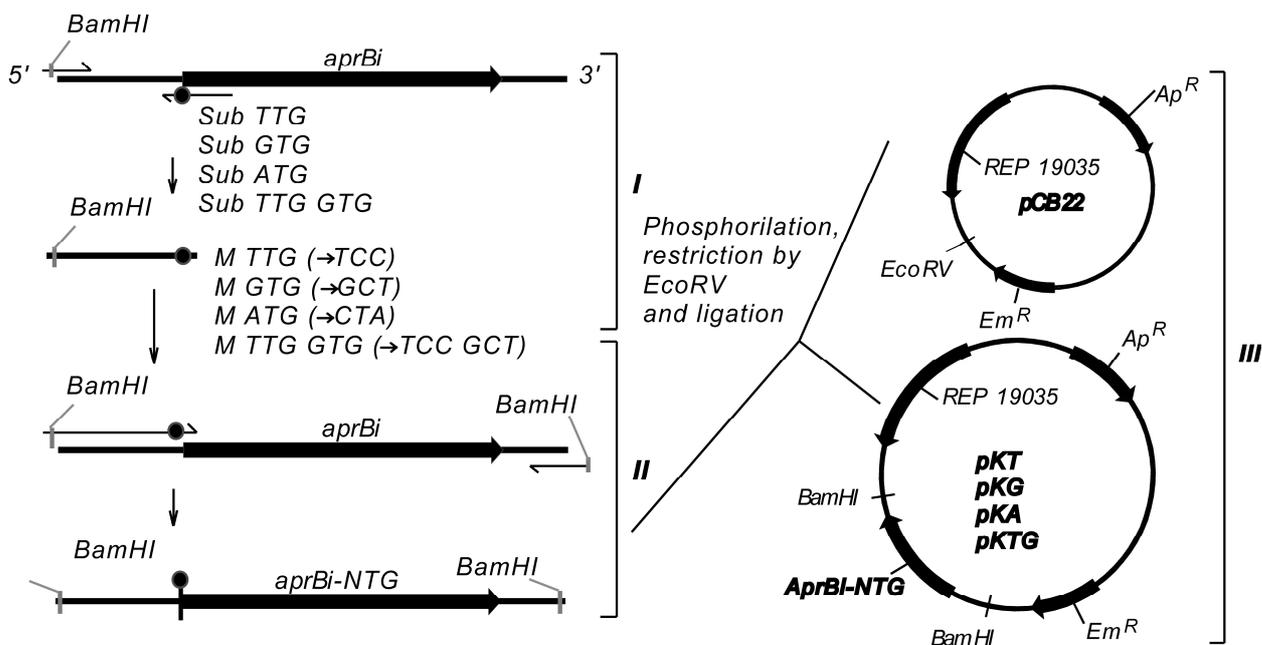


Рис. 4. Схема конструирования плазмид pKT pKG pKA и pKTG на основе вектора pCB22. I – первый этап конструирования мутантных генов *aprBi*: получение мегапраймеров, несущих замену двух нуклеотидов в одном из предполагаемых стартовых кодонов; II – второй этап: синтез мутантных генов *aprBi* с использованием продукта амплификации, полученного на первом этапе, в качестве одного из праймеров; III – третий этап: лигирование синтезированных модифицированных генов протеиназы AprVi в шаттл-вектор pCB22 [Sorokin, Khazak, 1990] по сайту *EcoRV*.

На первом этапе синтезировался фрагмент гена *aprBi*, несущий две нуклеотидные замены в одном или двух из предполагаемых сайтов инициации трансляции. При этом один из использованных праймеров (Pm1) имел сайт узнавания рестриктазой *BamHI*, а второй нес двойную нуклеотидную замену, ведущую к мутации одного из предполагаемых иницирующих кодонов: ATG→CTA (Met→Leu), GTG→GCT (Val→Ala), TTTG →TCC (Leu→Ser) (Sub ATG, Sub GTG, Sub TTTG, Sub TTTG GTG соответственно) (таблица 5). Продукт реакции был выделен из 1.5% агарозного геля после электрофореза, очищен и использован далее в качестве праймера. Второй праймер (Sub term) имел сайт узнавания рестриктазой *BamHI*. Полученные амплифицированные последовательности фосфорилировали на 5'-конце киназой фага T4 («Сибэнзим») и лигировали с вектором pCB22, который был предварительно линейаризирован рестриктазой *EcoRV* («Сибэнзим») с образованием тупых концов.

Синтетические олигонуклеотиды, использованные в работе

Название праймера	Последовательность праймера
Pm1	5' GAATGGGGATCCCTTGATTACAACGTGGTCAG 3'
Sub TTG	5' CTTTTTCACGCAGGATCCACATCCC 3'
Sub GTG	5' CTTTTTAGCGCACAATCCACATCCC 3'
Sub TTG GTG	5' CTTTTTAGCGCAGGATCCACATCCC 3'
Sub ATG	5' CAGCCAATAAAACAATTGTTAGCAC 3'
Sub term	5' AGAGAGGGATCCGAGAGGCAGGGGTGACGTCTTTTC 3'

* Нуклеотиды, ведущие к образованию мутаций выделены жирным. Сайт узнавания рестриктазой *BamH1* подчеркнут.

Полученными плазмидами трансформировали лабораторный штамм *B.subtilis* AJ73, дефектный по собственным внеклеточным протеиназам. Клоны отбирали рестрикционным анализом: выделенные плазмиды рестрицировали по *BamH1* и отбирали те, при расщеплении которых образовывались фрагменты величиной 1.8 kb в случае плазмид рКА и рКГ и величиной 1.4 и 0.4 kb в случае плазмид рКТ и рКГТ.

Анализ последовательности гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* проводили с использованием алгоритма BLAST и пакета программ, представленных на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [Altschul et al., 1997]. Поиск открытой рамки считывания и иницирующих кодонов проводили с помощью программы ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf). Потенциальный старт-кодон трансляции определяли с использованием алгоритма SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), который дает возможность определить вероятность функционирования олигопептида в качестве сигнальной последовательности белка [Bendtsen et al., 2004].

Определение точки инициации трансляции в последовательности гена субтилизиноподобной протеиназы AprVi начали с идентификации возможных стартовых кодонов с использованием пакета программ BLAST (рисунок 5).

Путем сравнительного анализа последовательностей генов протеиназ AprVi, AprE и AprP было выявлено 2 потенциальных стартовых кодона – TTG (1) и GTG (2). Программный анализ последовательности с помощью программы ORF Finder позволил выявить третий потенциальный сайт инициации синтеза белка – ATG (3) (рисунок 6).

Значения вероятностей функционирования в качестве препоследовательности полипептидов, образующихся с различных иницирующих кодонов

№	Потенциальные старт-кодоны	Значения вероятностей
1	TTG	0.998
2	GTG	0.964
3	ATG	0.677

Чтобы установить, какой из предполагаемых кодонов является стартовым, были сконструированы мутантные гены субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*, в которых проведена замена нуклеотидов в предполагаемых сайтах инициации трансляции (рисунок 2). Замены нуклеотидов подбирались таким образом, чтобы происходила замена на аминокислоту, сходную по свойствам. В результате были получены плазмиды рКА, рКТ, рКГ и рКТГ, в которых имеются мутации в сайтах: ATG→СТА, TTG→ТСС, GTG→GCT, TTG→ТСС и GTG→GCT, соответственно (рисунок 6).

Плазмиды рКА, рКТ, рКГ, рКТГ были трансформированы в лабораторный штамм *B. subtilis* AJ73, дефицитный по собственным внеклеточным протеиназам. В качестве контроля использовали этот же реципиентный штамм, в который трансформировали плазмиду рСS9 с исходным геном *aprVi*. Экспрессию нативного и модифицированных генов *aprVi* исследовали при выращивании бактерий на среде LB. Нами установлено, что экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы *AprVi* рекомбинантным штаммом *B.subtilis* AJ73 (рКА), несущим ген протеиназы с мутацией в сайте ATG, сохраняется и не отличается по уровню экспрессии от контрольного штамма *B. subtilis* AJ73 (рСS9) (рисунок 7а).

Эти данные позволили предположить, что мутации в кодоне ATG не влияют на трансляцию с мРНК протеиназы. У штаммов, несущих ген протеиназы с двойной мутацией по сайтам GTG и TTG, протеолитическая активность в культуральной жидкости отсутствовала на протяжении 48 часов культивирования (рисунок 7б). По-видимому, целостность одного из этих сайтов необходима для эффективной трансляции. Этот факт свидетельствовал, что синтез протеиназы может начинаться с одного из модифицированных кодонов: TTG или GTG. При дефекте сайта TTG уровень экспрессии гена *aprVi* снижался в 3 раза по сравнению с контролем (рисунок 7в). Поскольку полного подавления продукции фермента не наблюдалось, было сделано заключение, что этот кодон также не является иницирующим в гене протеиназы *AprVi*. Исследование динамики

накопления протеолитической активности в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B.subtilis* AJ73 (pKG) показало, что мутация триплета GTG приводит к полному подавлению экспрессии гена *aprVi* (рисунок 7г). По-видимому, синтез субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* начинается с GTG кодона.

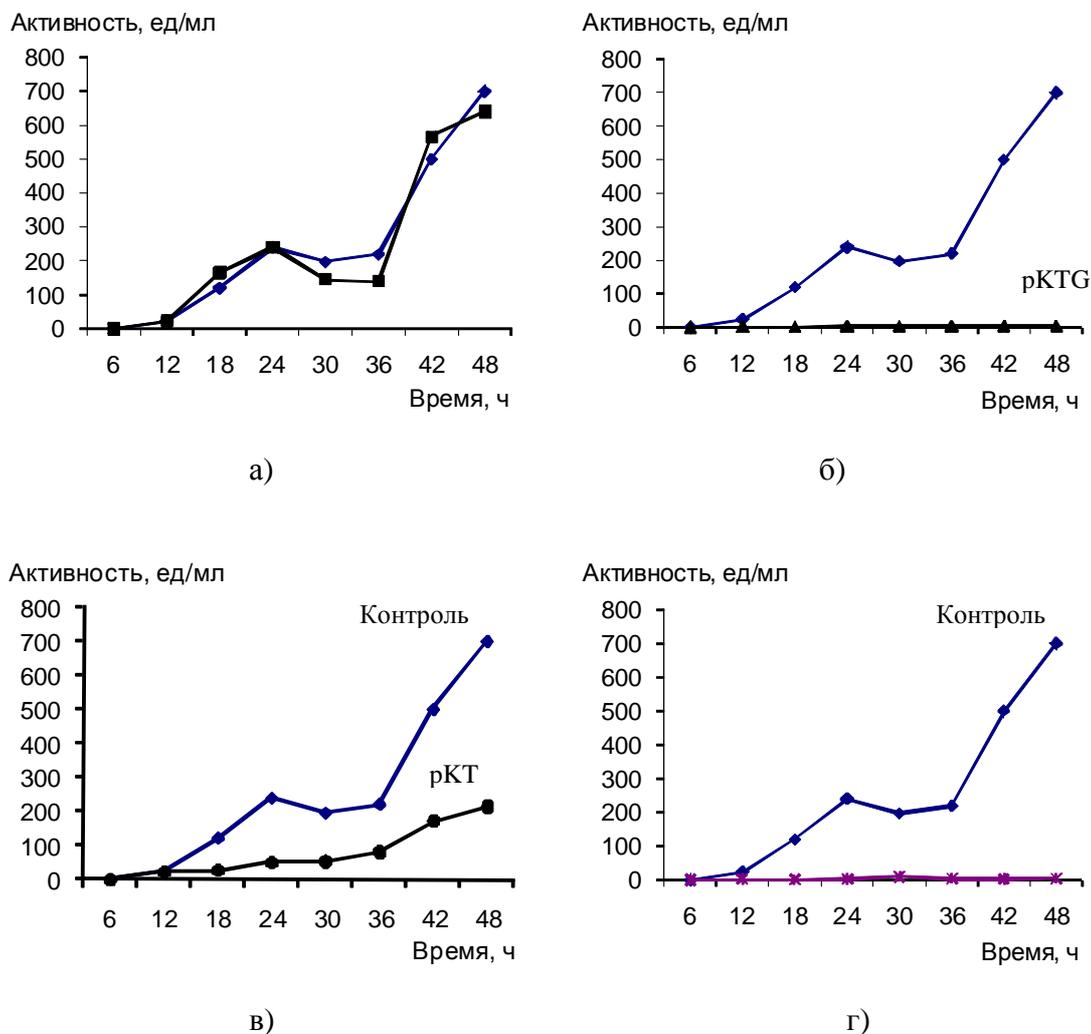


Рис. 7. Экспрессия генов субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*, несущих нуклеотидные замены в предполагаемых сайтах инициации трансляции, рекомбинантными штаммами *B.subtilis*. Контроль – *B.subtilis* AJ73 (pCS9); а – *B.subtilis* AJ73 (pKA); б – *B.subtilis* AJ73 (pKTG); в – *B.subtilis* AJ73 (pKT); в – *B.subtilis* AJ73 (pKG).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что трансляция в гене *aprVi* начинается с нестандартного кодона GTG. Анализ геномов прокариот показал, что в генетическом аппарате бактерий, кроме классического старт-кодона ATG, в 10% и 12%

открытых рамок считывания стартовыми кодонами являются GTG и TTG, соответственно [Rocha et al., 1999]. Так, в гене близкого структурного и функционального гомолога протеиназы AprBi – субтилизина E из *B.subtilis* – трансляция начинается с нестандартного GTG кодона [Ferrari et al., 1988], в то время как в гене *aprP*, имеющем максимальную степень идентичности с геном *aprBi*, стартовым является кодон ATG [Aoyama et al., 2000].

Отметим, что в случае мутации триплета TTG уровень протеолитической активности в культуральной жидкости снижался в 2-4 раза по сравнению с контролем. Возможно, это связано с образованием шпильки в результате замены нуклеотидов, которая находится между сайтом связывания с рибосомой и стартовым кодоном и может отрицательно влиять на связывании рибосомы с матричной РНК.

В литературе описаны примеры, когда при смене механизмов регуляции продукты одного гена отличаются по свойствам и функциям, в частности, вследствие трансляции с разных стартовых кодонов, как это показано для генов *clpA*, *clpB*, *infB*, *nolA* [Morel-Deville et al., 1990; Park et al., 1993; Seol et al., 1994; Loh et al., 1999]. Характер экспрессии модифицированных генов *aprBi* не менялся в зависимости от фазы роста бактерий: при замене нуклеотидов в сайте GTG активность субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* отсутствовала в культуральной жидкости как на 24, так и на 48 ч роста. Этот факт позволяет сделать заключение, что трансляция гена протеиназы на разных фазах физиологического роста, как в период вегетативного роста, так и во время дифференцировки, начинается с одного и того же кодона.

1.3. Выявление молекулярно-генетических отличий штаммов микоплазм, продуцирующих токсические метаболиты, от нетоксигенных штаммов, и характеристика условий усиления/ослабления токсигенных детерминант

В ходе выполнения 1 и 2 этапов работ по настоящему государственному контракту было показано, что продукция токсических, в том числе генотоксических метаболитов у микоплазм (*A. laidlawii*, *M. gallisepticum*, *M. hominis*) зависит от условий культивирования соответствующих бактерий. Некультивируемые формы микоплазм и их культуральная жидкость генотоксических свойств не проявляют. Таким образом, для всех трех исследуемых микоплазм было установлено наличие генотоксического эффекта в случае выращивания в оптимальных условиях среды, но отсутствие генотоксического эффекта при длительной инкубации в условиях стресса (голодание), то есть для не адаптированных и адаптированных к стрессовым условиям культурам, представленным вегетативными и некультивируемыми формами бактерий соответственно. В этой связи исследования, посвященные выявлению молекулярно-генетических отличий штаммов микоплазм,

продуцирующих токсические метаболиты, от нетоксигенных штаммов был сосредоточен далее на соответствующих культурах бактерий.

В результате анализа полученных нами данных трансмиссивной и зондовой микроскопии было установлено, что в культурах микоплазм, выращенный как в оптимальных, так и стрессовых условиях, помимо типичных клеток присутствуют ультрамикрoформы – сферические, окруженные мембраной наноструктуры диаметром менее 120 нм. (рис. 8, 9). В стрессовых условиях количество соответствующих ультрамикрoформ в культуре микоплазмы достоверно возрастает (рис. 10, 11, 12).

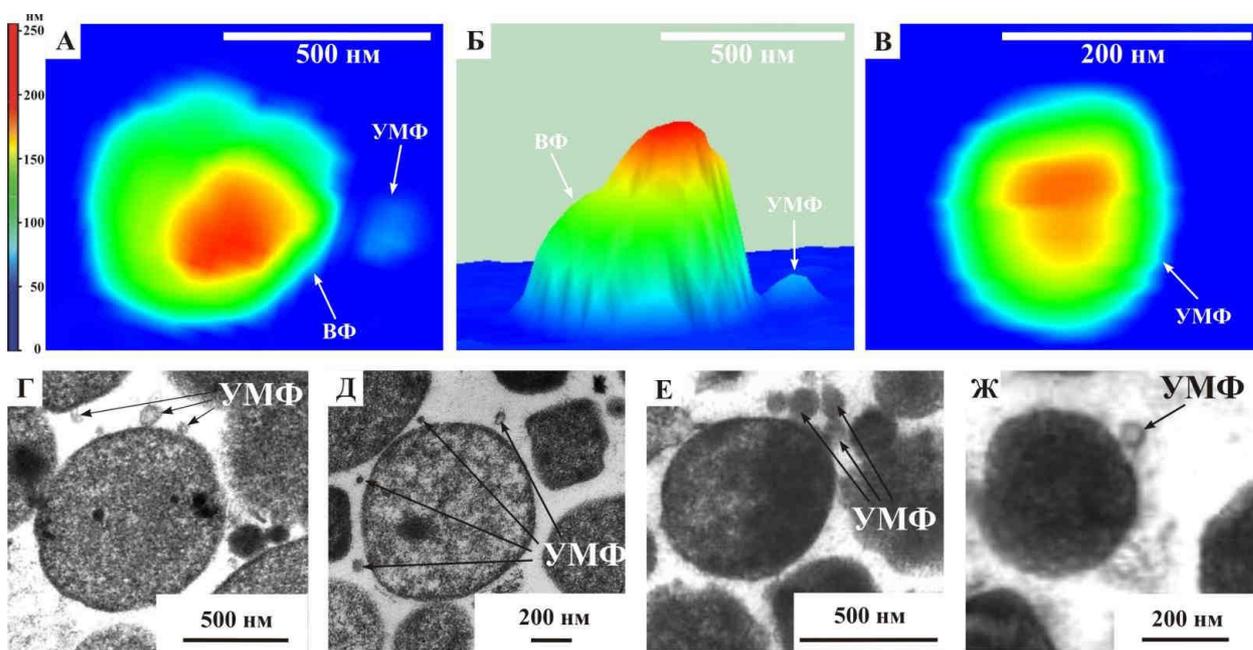


Рис. 8. Клетки и ультрамикрoформы *A. laidlawii* PG8. А, Б, В – атомно-силовая микроскопия (2D – А, В; 3D – Б); Г, Д, Е, Ж – трансмиссивная электронная микроскопия.

ВФ – "типичные" клетки микоплазмы (вегетативные формы),

УМФ – ультрамикрoформы.

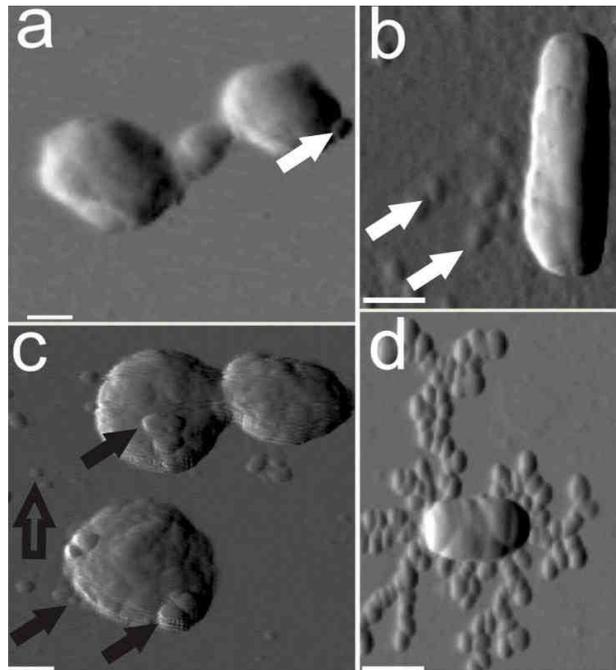


Рис. 9. Атомно-силовая микроскопия клеток *A. laidlawii* PG8 (a, c) and *M. gallisepticum* S6 (b, d), культивированных в оптимальных (a, b) и стрессовых условиях (c, d).

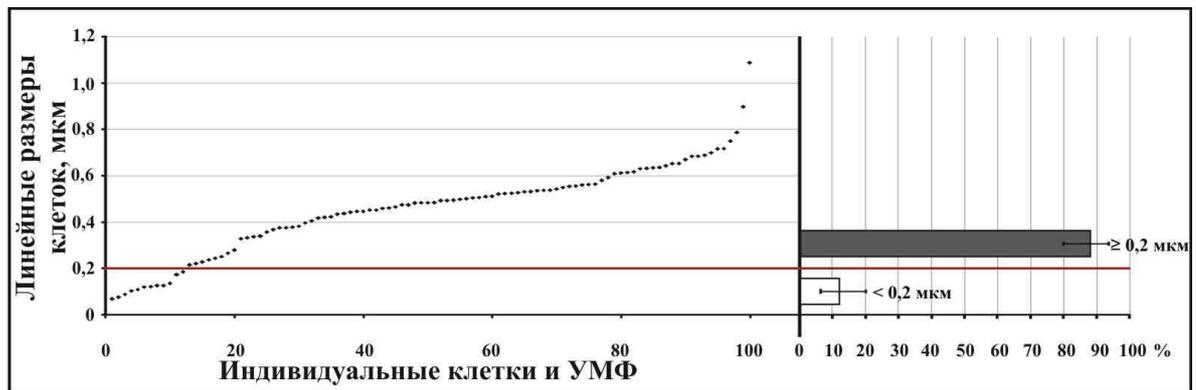


Рис. 10. Соотношение типичных клеток и УМФ в культуре *A. laidlawii* PG8 при культивировании микоплазмы в стрессовых – условиях (по данным ТЭМ).

График построен на основе линейных размеров индивидуальных клеток и УМФ (от минимальных к максимальным). Каждая точка соответствует линейному размеру индивидуальной клетки или УМФ. Обследовалось по 100 объектов в разных полях зрения. Диаграммы справа отражают изменения соотношений клеток и УМФ в контрольной и опытной культурах микоплазмы. * – $p < 0,01$.

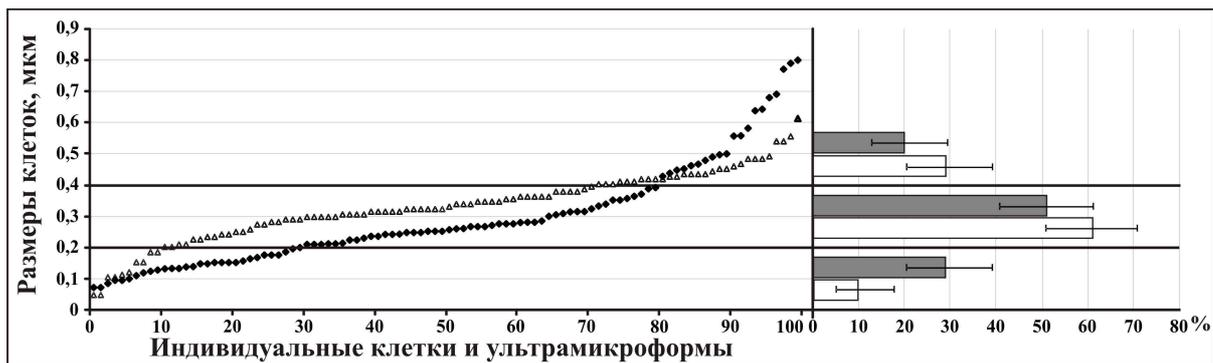


Рис. 11. Соотношение индивидуальных клеток и ультрамикроформ *M. hominis* PG37 в контроле (Δ) и опыте (\blacklozenge) по данным трансмиссивной электронной микроскопии. График построен на основе линейных размеров индивидуальных клеток и ультрамикроформ в культуре микоплазмы, сортированных от минимальных к максимальным. Анализировали по 100 объектов в разных полях зрения. Каждая точка соответствует линейному размеру индивидуального объекта. Диаграммы справа отражают изменения соотношения клеток и ультрамикроформ в культуре *M. hominis* PG37 в стрессовых условиях.

□ – контроль, ■ – опыт.

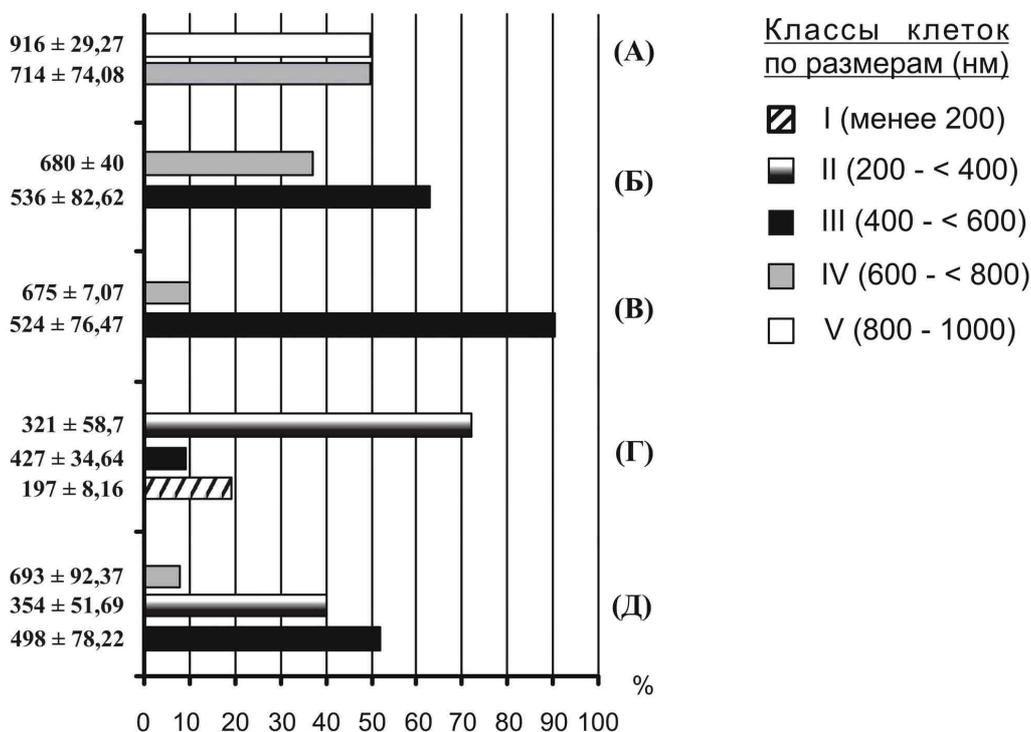


Рис. 12. Изменение основных модальных классов клеток *M. gallisepticum* S6, культивируемых на ППСЭ (А) и в НУ в течение 3 (Б), 12 (В), 16 (Г) и 20 (Д) недель.

На оси ординат – среднее значение длины клеток (нм) \pm стандартное отклонение.

В результате наноскопического анализа нами также было обнаружено, что токсигенные и нетоксигенные штаммы микоплазм различаются по метрическим параметрам ДНК клеток. (рис. 13, 14, таблицы 7, 8, 9).

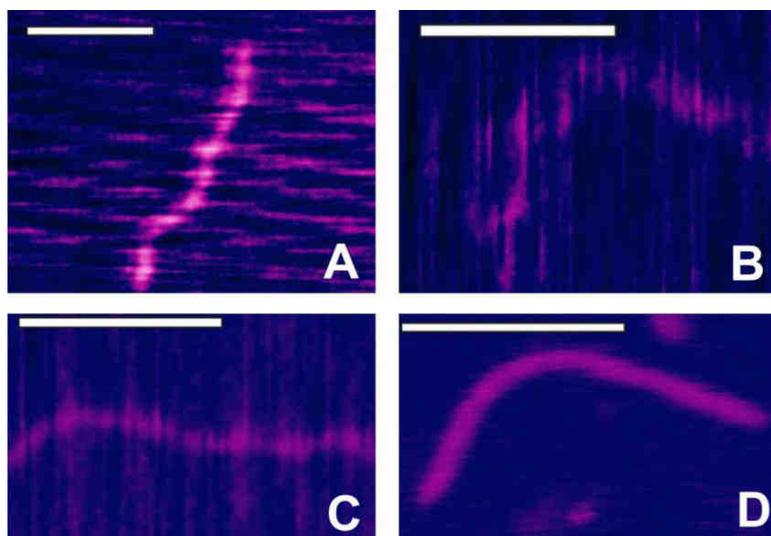


Рис. 13. Атомно-силовая микроскопия ДНК клеток *M. hominis* PG37 (А, В) и *A.laidlawii* PG8 (С, D), культивированных в оптимальных (А, С) и стрессовых (В, D) условиях. Отрезок соответствует 100 нм.

Таблица 7

Метрические параметры (ширина и высота) ДНК неадаптированных и адаптированных клеток *A. laidlawii* PG8

Параметр ДНК, нм	Неадаптированные клетки <i>A. laidlawii</i> PG8	Адаптированные клетки <i>A. laidlawii</i> PG8
Высота	0.255±0.039	0.641±0.255
Ширина	1.898±0.437	1.506±0.282

Таблица 8

Метрические параметры (ширина и высота) ДНК неадаптированных и адаптированных клеток *M. hominis* PG37

Параметры ДНК, нм	Контрольная культура <i>M. hominis</i> PG37	Опытная культура <i>M. hominis</i> PG37
Высота	0,391±0,093	0,177±0,059
Ширина	2,17±0,347	1,92±0,224

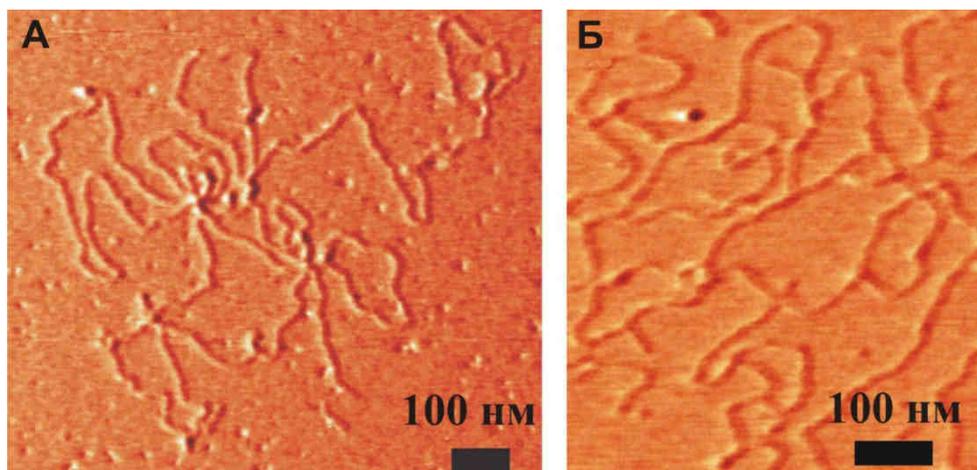


Рис. 14. Атомно-силовая микроскопия ДНК клеток *M. gallisepticum* S6, культивируемых в оптимальных (А) и стрессовых (Б) условиях.

Таблица 9

Метрические параметры (ширина и высота) ДНК неадаптированных и адаптированных клеток *M.gallisepticum* S6

Параметр ДНК, нм	Неадаптированные клетки <i>M.gallisepticum</i> S6	Адаптированные клетки <i>M.gallisepticum</i> S6
Высота	0.461±0.141	0.236±0.069
Ширина	2.221±0.286	1.291±0.705

Данные протеомного анализа также свидетельствовали о существенных различиях в профилях растворимых белков токсигенных и нетоксигенных штаммов микоплазм (рис. 15, 16, 17).

В результате 2D-DIGE нами было выявлено 106, 63 и 53 белков (с учетом изоформ), дифференциально экспрессированных у адаптированных и неадаптированных к стрессовым условиям клеток *A.laidlawii* PG8, *M.gallisepticum* S6 и *M.hominis* PQ37 соответственно.

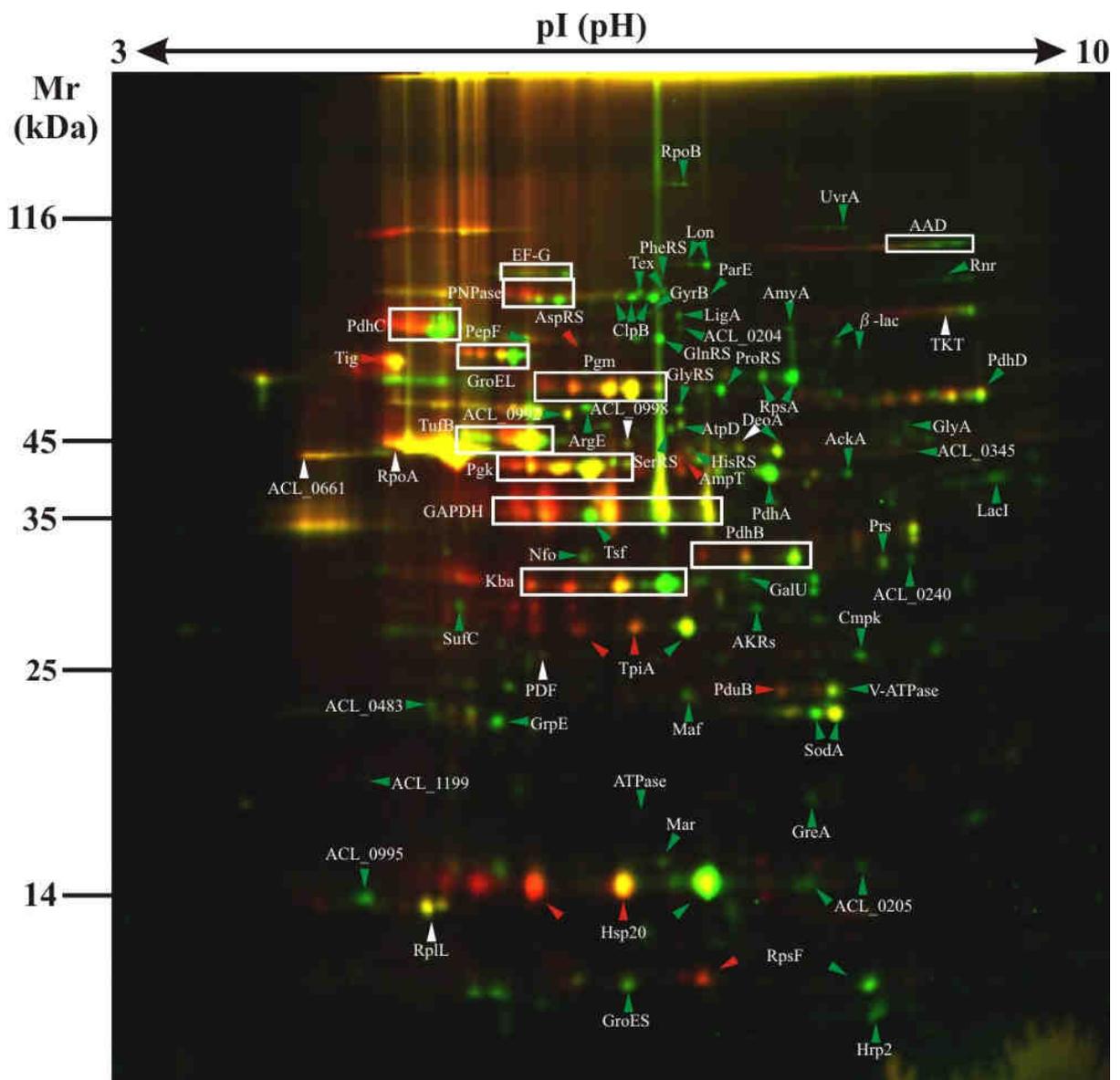


Рис. 15. 2-D электрофорез дифференциально окрашенных белков адаптированных и неадаптированных к стрессовым условиям клеток *A.laidlawii* PG8.

Стрелками обозначены дифференциально экспрессированные белки микоплазмы; ▲ или ▲ – экспрессия повышена у контрольной или опытной культуры соответственно; – изоформы белков.

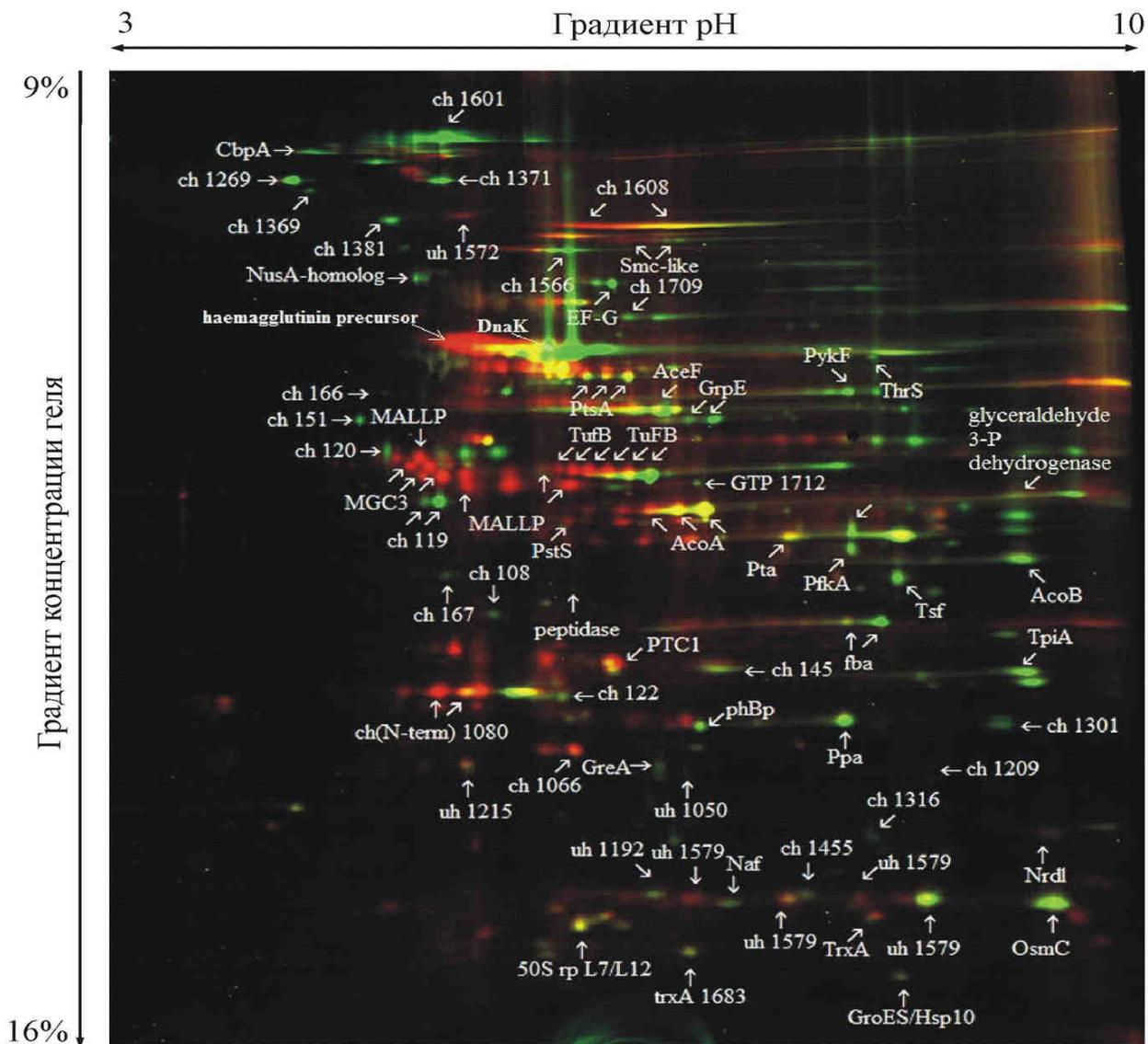


Рис. 16. 2-D электрофорез дифференциально окрашенных белков адаптированных (красный цвет) и неадаптированных (зеленый цвет) к стрессовым условиям клеток *M.gallisepticum* S6.

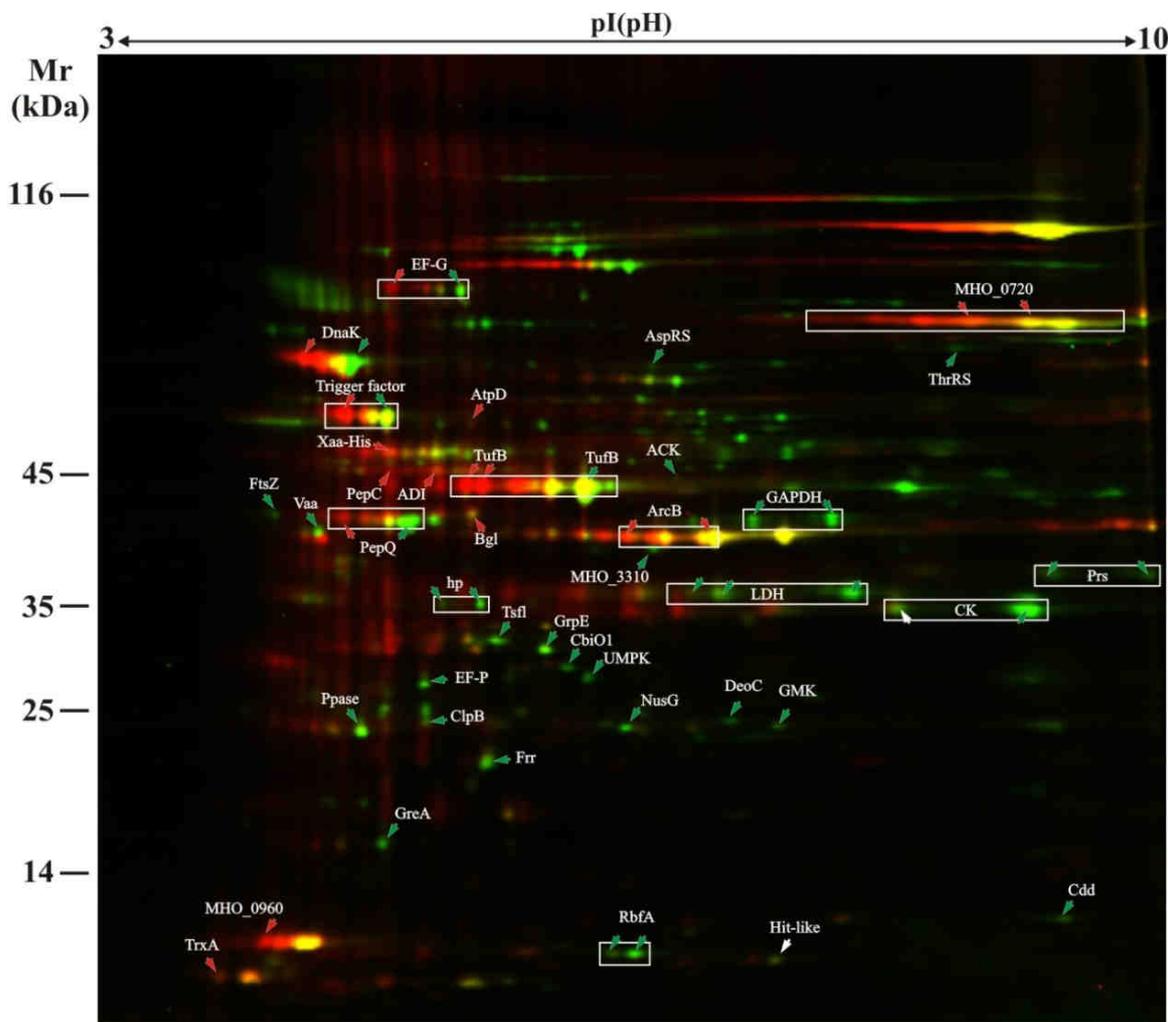


Рис. 17. 2-D электрофорез дифференциально окрашенных белков адаптированных и неадаптированных к стрессовым условиям клеток *M.hominis* PQ37.

Стрелками обозначены дифференциально экспрессированные белки микоплазмы; ▲ или ▲ – экспрессия повышена у контрольной или опытной культуры соответственно; □ – изоформы белков.

Согласно COG, подавляющее большинство соответствующих белков микоплазм участвует в фундаментальных клеточных процессах бактерии (репликация, репарация, рекомбинация, транскрипция, трансляция, защитные механизмы, энергообразование, транспорт и метаболизм углеводов, аминокислот и нуклеотидов, биогенез мембран, сигнальная трансдукция).

Гены белков, определяющих молекулярно-генетические отличия адаптированных и неадаптированных к стрессовым условиям микоплазм – токсигенных и нетоксигенных штаммов бактерий, указаны на рис. 18, 19, 20 .

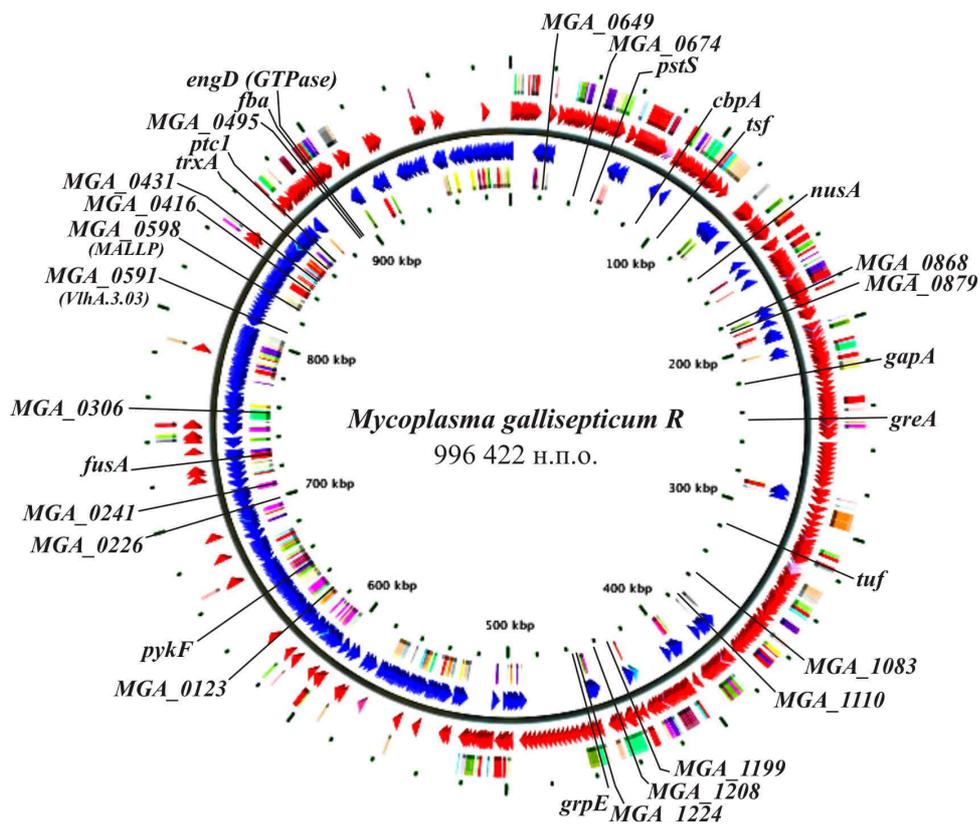


Рис. 20. Локализация генов стресс-реактивных белков на геномной карте *M.gallisepticum* .

Значительная часть белков, для которых наблюдается пониженный уровень экспрессии у нетоксигенных штаммов микоплазм, являются факторами вирулентности, что позволяет предполагать различия их вирулентных свойств. Это было подтверждено далее в наших специальных экспериментах по сравнительному анализу патогенности вездесущей микоплазмы - *A.laidlawii* PG8. Нами было обнаружено, что при культивировании растений на средах, содержащих *A. laidlawii* PG8, клетки не адаптированной к стрессовым условиям микоплазмы, в отличие от адаптированной, проникают через корневую систему растений и распространяется по тканям, обнаруживаясь, в частности, на 7 день в листьях. Однако в обоих случаях в тканях листьев растений возникают значительные изменения ультраструктурной организации (рис. 21).

Протеомы листьев растений, выращенных на средах, содержащих адаптированные и неадаптированные клетки микоплазмы, тем не менее существенно различаются. Так, 11 из 43 идентифицированных патоген-реактивных белков оказались специфичными в отношении микоплазмы, выращенной в оптимальных условиях, а 19 – в стрессовых и только 13 общими.. Поскольку клетки адаптированной *A. laidlawii* PG8 не проникают в ткани растений, но вызывают ответные реакции (в том числе выраженные деструктивные процессы), фитопатогенность бактерии может быть связана с проникновением в ткани растений метаболитов, секретируемых клетками микоплазмы.

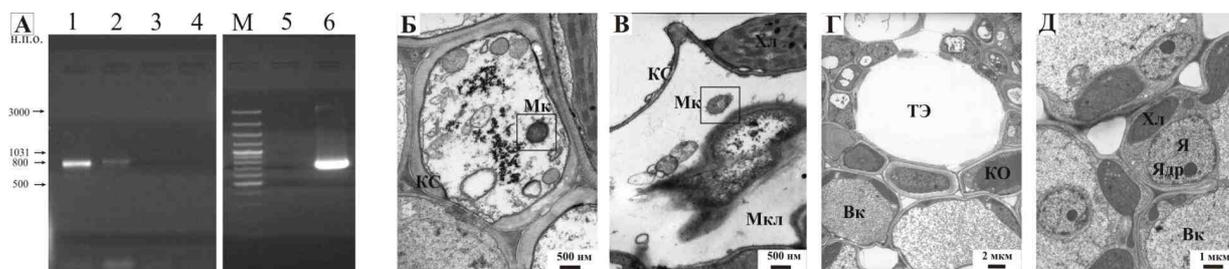


Рис. 21. Детекция *A. laidlawii* PG8 – ДНК (А) и клеток (Б, В, Г, Д) микоплазмы – в тканях растений (*O. sativa* L.) с помощью ПЦР и трансмиссивной электронной микроскопии. А - электрофореграмма продуктов амплификации нуклеотидной последовательности гена *trx* *A. laidlawii* PG8, полученных при использовании в ПЦР тотальной ДНК (в качестве матричной), выделенной из листьев растений, зараженных клетками контрольной (1, 2) и опытной (3, 4) культур микоплазмы, 5 и 6 – результаты амплификации реакционной смеси без ДНК микоплазмы и ДНК *A. laidlawii* PG8 (отрицательный и положительный контроль соответственно), М - маркер длины фрагментов.

Б, В, Г, Д – трансмиссивная электронная микроскопия ультратонких срезов растений, выращенных на средах, содержащих клетки микоплазмы, выращенные в оптимальных (Б, В) и стрессовых (Г, Д) условиях. Вк – вакуоль, КО – клетки обкладки, КС – клеточная стенка, Мк – микоплазмы, Мкл – межклетники, ТЭ – трахеидный элемент, Хл – хлоропласты, Я – ядро, Ядр – ядрышко.

Как уже выше указывалось, в культуре микоплазмы, помимо типичных клеток, присутствуют ультрамикрoформы, которые по размерам, морфологии, ультраструктуре и особенностям образования соответствуют мембранным везикулам бактерий, опосредующих секрецию белков микроорганизмов, в том числе факторов вирулентности, межклеточные взаимодействия и патогенез.

Показано, что мембранные везикулы бактерий, помимо липидов и белков, могут содержать ДНК и опосредовать, цито- и генотоксичность. В наших исследованиях это впервые было показано для микоплазм. Так, нами были выделены мембранные везикулы *A. laidlawii* PG8 (рис.22) и установлено, что в состав соответствующих образований помимо мембранных белков входят цитоплазматические белки (рис.23), а также ДНК, в том числе гены *dnaA*, *parE*, *parC*, *dnaK*, *trx*, *mutS* (рис.24), которые кодируют белки, участвующие в репликации, рекомбинации и репарации, транскрипции, трансляции, энергообразовании, метаболизме углеводов и нуклеотидов, а также вирулентности: белок инициации репликации хромосомы *DnaA* участвует в репликации хромосомы и регуляции экспрессии генов, субъединицы топоизомеразы *ParE* и *ParC* участвуют в репликации ДНК,

регуляции экспрессии генов, конденсации ДНК, регуляции деления клеток, расхождении хромосом, шаперон DnaK кроме фолдинга участвует в репликации ДНК, синтезе РНК, сборке рибосом, транспорте белков, делении клеток, регуляции экспрессии генов, инвазии, тиоредоксин участвует во многих клеточных процессах, прежде всего, в антиоксидантной защите, также известно его участие в апоптозе, делении клеток, энергообразовании, регуляции транскрипции, вирулентности, белок мис-матч репарации ДНК MutS участвует в репарации и рекомбинации ДНК.

Нуклеотидные последовательности ДНК, соответствующие генам *dnaA*, *parE*, *parC*, *dnaK*, *trx*, *mutS* также были выявлены нами в составе мембранных везикул *M.gallisepticum* S6 (25).

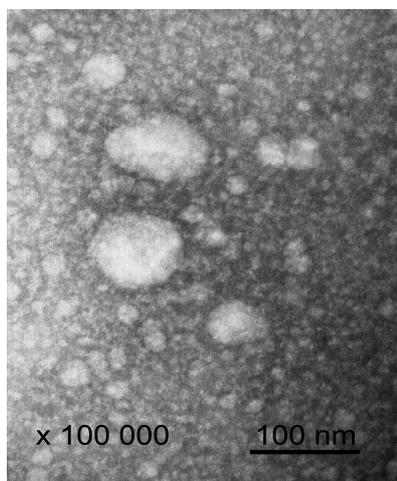


Рис. 22. Трансмиссивная микрография мембранных везикул *A. laidlawii* PG8 (негативное контрастирование).

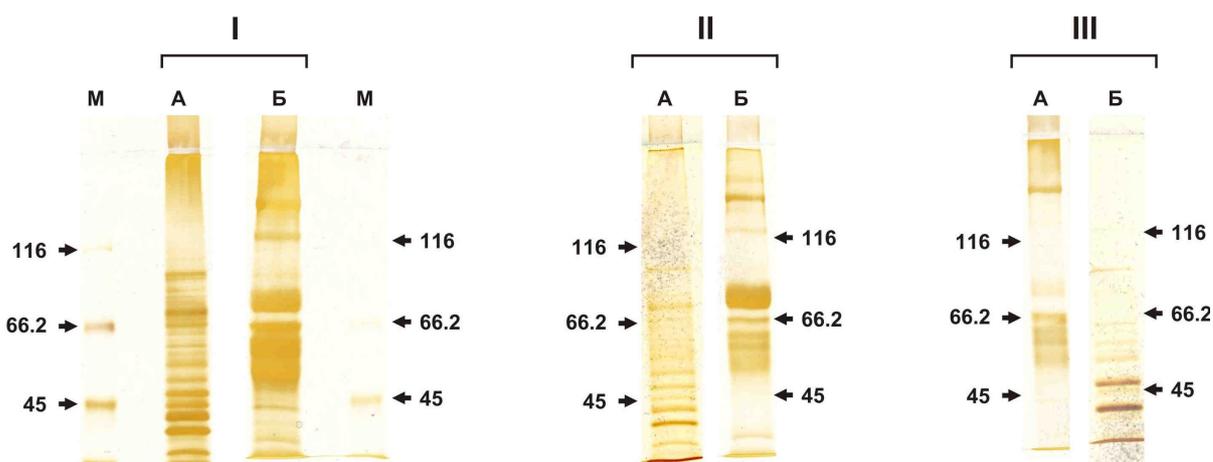


Рис. 23. 1D-электрофореграммы растворимых белков клеток (А) и мембранных везикул (Б) *A. laidlawii* PG8.

I, II, III – белки тотального лизата, мембранные и цитоплазматические соответственно.

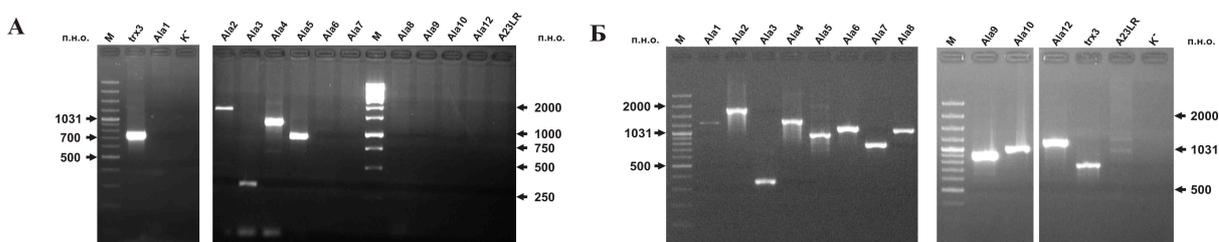


Рис 24. Электрофореграммы продуктов амплификации нуклеотидных последовательностей ДНК мембранных везикул (А) и клеток (Б) *A. laidlawii* PG8.

В ПЦР использованы праймеры комплементарные нуклеотидным последовательностям генов *trx* (*trx3*), *ftsZ* (*Ala1*), *dnaK* (*Ala2*), *mutS* (*Ala3*), *dnaA* (*Ala4*), *parE* и *parC* (*Ala5*), *pdhA* (*Ala6*), *fbpA* (*Ala7*, *Ala8*), *pdhC* (*Ala9*, *Ala10*), *pnp* (*Ala12*), *rtnA* и *rtnB* (*A23LR*) *A. laidlawii* PG8, К - - результат амплификации реакционной смеси без ДНК микоплазмы (отрицательный контроль), М - маркер длины фрагментов.

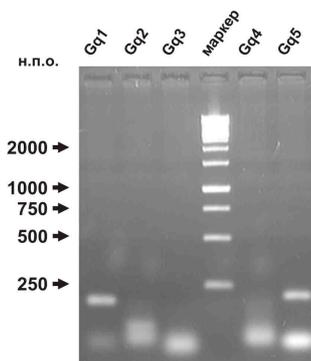


Рис 25. Электрофореграммы продуктов амплификации нуклеотидных последовательностей ДНК мембранных везикул *M. gallisepticum* S6.

Мембранные везикулы *A. laidlawii* PG8, как оказалось, обладают значительным мутагенным потенциалом. Так, в результате инкубации лимфоцитов периферической крови человека с мембранными везикулами *A. laidlawii* PG8, выращенной в оптимальных условиях, у 95% клеток возникают хромосомные aberrации, большинство из которых - множественная полисомия (рис.26). В этой связи мутагенность мембранных везикул микоплазмы, выращенной в стрессовых условиях, а также сравнительный анализ состава генов и белков мембранных везикул бактерий, выращенных в разных условиях среды, представляют значительный интерес как для фундаментальных, так и прикладных исследований, связанных с идентификацией факторов вирулентности, экспортируемых клетками микроорганизмов, и особенностей их трафика в стрессовых условиях. Проведение таких работ предполагает, однако, специальный исследовательский проект.

А



Б

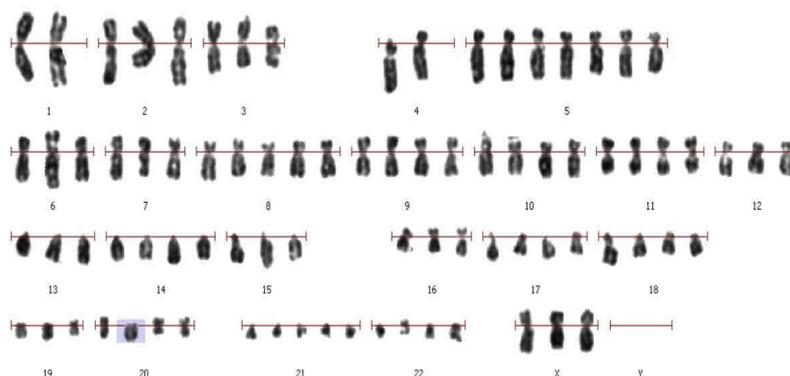


Рис. 26. Метафазная пластинка (А) и кариограмма (Б) лимфоцитов периферической крови человека после инкубирования клеток с мембранными везикулами *A. laidlawii* PG8.

Таким образом, в результате наших исследований в рамках данного проекта впервые выявлены молекулярно-генетические отличия токсигенных и нетоксигенных штаммов микоплазм, связанные с особенностями морфометрических параметров ДНК клеток бактерий, профиля растворимых белков, модуляции экспрессии факторов вирулентности и секреции нановезикулярных структур, которые помимо мембранных содержат цитоплазматические белки, а также гены, и проявляют высокую мутагенность в отношении клеток эукариот. Нами впервые было показано, что длительное пребывание микоплазм в стрессовых условиях (голодание по основному источнику энергии) приводит к значительному ослаблению их токсигенных детерминант. Полученные нами данные определяют необходимость проведения комплексных исследований нового класса инфектогенов – мембранных везикул микоплазм, обеспечивающих трафик факторов вирулентности бактерий в разных условиях среды. Такие исследования позволят разработать принципиально новые средства диагностики и подавления микоплазмозов, микоплазменных контаминаций клеточных культур и вакцинных препаратов – эффективные средства инфекционного контроля нового поколения.

1.4. Разработка программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс

После завершения каждого этапа выполнения работ по Государственному контракту в планы образовательных курсов по соответствующим тематике НИР курсам внедрялись полученные результаты. Ниже приведена справка о внедрении результатов НИР в образовательный процесс.

<p>СПРАВКА о внедрении результатов НИР в образовательный процесс</p> <p>Результаты полученные на 1 этапе НИР «Разработка способа модификации промоторов генов протеиназ с целью получения высокопродуктивных штаммов» используются в курсах «Основы геномики» (специалитет, 5 курс), «Основы регуляции метаболизма микроорганизмов (специалитет, 4 курс), «Промышленная микробиология и биотехнология» (магистратура, 1 курс), «Геномика и протеомика» (магистратура, 1 курс), «Инженерная энзимология» (специалитет, 5 курс).</p> <p>Результаты полученные на 2 этапе НИР «Выявление спектра секретируемых токсигенных метаболитов микоплазм» используются в курсах «Токсины» (специалитет, 4 курс), «Микоплазмология» (специалитет, 4 курс), «Микоплазменные инфекции» (магистратура 2 курс), «Токсины микроорганизмов» (магистратура, 1 курс).</p> <p>Результаты полученные на 3 этапе НИР «Определение вклада непрямого поражения РНКазми клеточных мишеней опухолевых клеток в проявление токсических эффектов микробных рибонуклеаз» используются «Токсины» (специалитет, 5 курс), «Регуляция клеточного метаболизма и вторичные посредники» (специалитет, 5 курс), «Молекулярные механизмы регуляции метаболизма» (специалитет, 5 курс), «Ферменты микроорганизмов» (магистратура 1 курс).</p> <p>Результаты полученные на 4 этапе НИР «Оценка вклада экспрессии онкогенов kit и AML/ETO в селективность действия РНКаз по отношению к онкотрансформированным линиям клеток» используются в курсах «Регуляция клеточного метаболизма и вторичные посредники» (специалитет, 5 курс), «Молекулярные механизмы регуляции метаболизма» (специалитет, 5 курс), «Клеточная сигнализация» (специалитет, 3 курс).</p> <p>Результаты полученные на 5 этапе НИР «Оптимизация сайтов взаимодействия с позитивными белками-регуляторами в промоторной области генов для эффективной экспрессии протеиназ» используются в курсах «Основы геномики» (специалитет, 5 курс), «Основы регуляции метаболизма микроорганизмов (специалитет, 4 курс), «Промышленная микробиология и биотехнология» (магистратура, 1 курс), «Геномика и протеомика» (магистратура, 1 курс), «Инженерная энзимология» (специалитет, 5 курс)</p> <p>Декан биолого-почвенного факультета  Р.М.Сабиоров</p> <p style="text-align: center;"></p>
--

1.5. Протеомный анализ вегетативных и некультивируемых форм микоплазм

Реализация вирулентности (инфекционность, инвазивность, токсигенность и персистенция) микоплазм предполагает их успешное преодоление воздействия неблагоприятных условий среды (НУС) – окислительного стресса, ограничения и изменения субстрата, колебания температуры среды и некоторых других.

Зондовая наноскопия, обеспечивающая визуализацию как 2Д-, так и 3Д-изображений живых клеток, определяет возможность проведения их морфометрического анализа, а реализация геномных проектов в отношении *A. laidlawii*, *M. gallisepticum* и *M. hominis* - исследований молекулярно-генетических особенностей клеток микоплазм, образующихся в различных условиях среды. Данные о соответствующих исследованиях в литературе отсутствуют. В этой связи выяснение особенностей морфологии, ультраструктуры и экспрессии белков клеток микоплазм, образующихся в РУС, при использовании методов атомно-силовой микроскопии и протеомного анализа явилось задачей нашей работы.

В работе были использованы штаммы *Acholeplasma laidlawii* PG8, *M. gallisepticum* S6 и *M. hominis* PQ37, полученные из коллекции микроорганизмов Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН,

Клетки микоплазм, образующиеся в оптимальных условиях (полноценная питательная среда Эдварда, 37°C), составили контрольные образцы, а клетки микоплазмы, образующиеся в стрессовых условиях (ограничение субстрата, 30°C) – опытные. Анализ образцов проводили на сроках 36 часов и 8 недель, соответственно. Культуру клеток микоплазм центрифугировали в течение 20 мин при 18514 g; осадок промывали, центрифугируя 2 раза в буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис, 2 мМ MgCl₂·6H₂O, pH 7.4, при 18514 g в течение 20 мин, а затем в том же буфере с добавлением ингибитора протеаз PMSF (“Fluka”) при 18514 g в течение 20 мин и хранили при –84°C. Перед проведением 2D-электрофореза осадок клеток микоплазм обрабатывали смесью нуклеаз (“Amersham”). Белки растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины, 2 М тиомочевину, 2% амфолинов (pH 3–10), 80 мМ дитиотреитол (ДТТ), 16.7% раствора (30% CHAPS (“Amersham”) и 10% NP 40). Образцы центрифугировали в течение 15 мин при 13000 g. Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Бредфорд с помощью Quick Start Bradford Dye Reagent (“Bio-Rad”). Белки метили цианинами CyDye3-DIGE (зеленая флуоресценция) и CyDye5-DIGE (красная флуоресценция) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (“Amersham”). После остановки реакции с помощью 10 мМ раствора

лизина добавляли ДТТ до концентрации 100 мМ и амфолины (pH 3–10) до концентрации 1%.

Изоэлектрофокусирование проводили в 4%-ном полиакриламидном геле в стеклянных восемнадцатисантиметровых трубочках. Использовали следующие реактивы: вода для хроматографии (“Merck”), 8 М мочевины, 4%-ный акриламид/метиленабисакриламид, 1.75% амфолины (pH 3–10), 3.5% амфолины (pH 5–8), 6% раствора 30% CHAPS, 10% NP 40, 0.1% ТЕМЕД, 0.02% персульфат аммония (“Amersham”). Фокусирование осуществляли в следующем режиме: 100 V–200 V–300 V–400 V–500 V–600 V – по 45 мин, 700 V – 10 ч, 900 V – 1–2 ч. После завершения изоэлектрофокусирования трубочки уравнивали в течение 30 мин в буфере, содержащем 6 М мочевины, 30% глицерин, 62.5 мМ Трис-НСl (pH 6.8) (“Amersham”), 2% додецилсульфат натрия (“Bio-Rad”), бромфеноловый синий (“Sigma”) и 20 мМ ДТТ. Затем трубочки переносили на поверхность градиентного (9–16%) полиакриламидного геля и закрепляли 0.9%-ной агарозой с бромфеноловым синим. Электрофорез проводили в трис-глицериновом буфере при охлаждении в следующем режиме: по 20 мА на стекло – 20 мин, по 40 мА на стекло – 2 ч, по 35 мА на стекло – 2.5 ч.

Электрофореграммы сканировали на сканере Typhoon Trio Scanner (“Amersham”) при длинах волны лазера 532 нм (зеленая флуоресценция) и 633 нм (красная флуоресценция). Изображения обрабатывали с использованием программы PDQuest (“Bio-Rad”).

Сравнительный анализ белковых спектров выполняли с использованием программы Phoretix 2D Advanced (v. 6.01) (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, Великобритания). Значимой для различий в уровне белков в опыте и контроле считали величину ≥ 1.5 . Гели маркировали и окрашивали нитратом серебра, белковые пятна вырезали и идентифицировали.

Белки, после их экстракции из геля и трипсинолиза, идентифицировали с помощью MALDI-TOF/TOF на масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов в диапазоне 500–4000 Да с использованием рефлектрона. Точность измеренных моноизотопных масс в рефлекто-моду после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.007% с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом. Идентификацию белков по “пептидному отпечатку” осуществляли при помощи программы Mascot Peptide Fingerprint (Matrix Science, Великобритания, <http://www.matrixscience.com>). Поиск проводили в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>), содержащей полную нуклеотидную

последовательность генома микоплазм. При параметре достоверности “score” > 67 идентификация белка считалась надежной ($p < 0.05$).

Трансмиссивную электронную микроскопию клеток микоплазмы проводили согласно [Cole, 1983]. Клетки микоплазмы собирали центрифугированием при 5500 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок переносили в полипропиленовую пробирку, клетки собирали центрифугированием при 8700 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Осадок фиксировали в 2.5%-ном растворе глутарового альдегида, приготовленном на фосфатно-солевом буфере (0.1 М, pH 7.2), в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Затем материал выдерживали в 1%-ном растворе OsO₄, приготовленном на том же буфере, с добавлением 25 мг/мл сахарозы в течение 1.5 ч. Осадок промывали фосфатно-солевым буфером (0.1 М, pH 7.2).

Дегидратацию образцов проводили с использованием серии спиртов в возрастающих концентрациях: ополаскивали в 30%-ном растворе, затем выдерживали 3 раза по 10 мин в 50%-ном растворе, в 60%-ном растворе – 3 раза по 10 мин, в 70%-ном – 3 раза по 10 мин, в 80%-ном – 3 раза по 10 мин, в 90%-ном – 4 раза по 15 мин, в чистом ацетоне – 2 раза по 10 мин.

После дегидратации препараты выдерживали в окиси пропилена в течение 45 мин, после чего пропитывали смолами (ЭПОН 812, DDSA, MNA, DMP-30) и окисью пропилена по 1 ч при 37°C в следующих соотношениях: 1 : 2; 1 : 1; 2 : 1; затем материал помещали в чистую смолу на 1–1.5 ч при 45°C. Полимеризацию проводили при температуре 37, 45 и 60°C по 12 ч. Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III (Швеция), монтировали на никелевые сеточки, окрашивали водным раствором урацилацетата и цитратом свинца. Образцы просматривали на электронном микроскопе JEM-1200EX (Япония).

Статистическую обработку данных выполняли при помощи программного обеспечения MS Excel (Microsoft). При сравнении количества клеток в классах использовали критерий χ^2 (p) с поправкой Йейтса на непрерывность. Значимость различий оценивали с помощью 95%-ного доверительного интервала для генерального значения частоты, который вычисляли с помощью точной формулы с использованием F -распределения. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

В результате анализа данных зондовой наноскопии было установлено, что популяция контрольной культуры *A. laidlawii* PG8 состоит, в основном, из типичных клеток микоплазмы - вегетативных форм (ВФ) диаметром 0,2-0,8 мкм, а опытная – ультрамикрформ (УМФ), диаметр которых составляет 0,2 мкм и менее. Аналогичные данные были получены нами также для *M. gallisepticum* S6 и *M. hominis* PG37 (рис. 27).

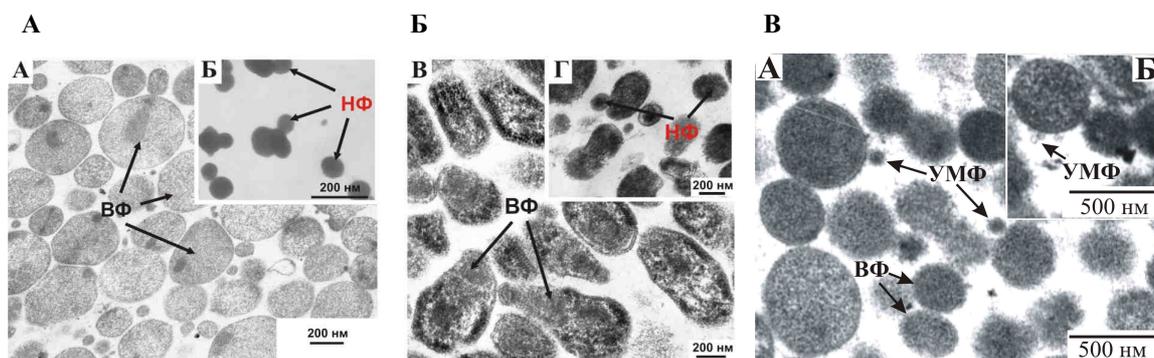


Рис. 27. Трансмиссивные микрофотографии клеток *A. laidlawii* PG8 (А), *M. gallisepticum* S6 (Б) и *M. hominis* PG37 (В), образующихся на питательной среде Эдварда (А, В) и в неблагоприятных условиях (на врезках, соответственно).

По данным трансмиссивной электронной микроскопии, клетки опытной культуры, в отличие от контрольной, имеют высокую электронную плотность и конденсированный нуклеоид. Конденсация нуклеоида, возникающая у бактерий в НУС, может обуславливаться специфичными ассоциатами ДНК и определять изменения матричных свойств молекулы.

Различия ультраструктуры, а также топологии ДНК клеток контрольной и опытной культур *A. laidlawii* PG8 позволяют предполагать существенные различия протемных профилей вегетативных и некультивируемых форм бактерий, связанных с реорганизацией экспрессии геномов микроорганизмов при адаптации их к стрессовым условиям среды. Результаты проведенного нами протеомного анализа подтвердили это предположение.

Протеомное профилирование бактерий в РУС позволяет выявлять специфичные и универсальные стресс-реактивные белки, которые участвуют у микроорганизмов в адаптации к НУС и реализации вирулентности [Renzone *et al.*, 2005]. Поиск соответствующих белков у бактерий представляет значительный интерес для определения механизмов выживания микроорганизмов в стрессовых условиях и разработки способов контроля патогенов [Goulhen *et al.*, 2003a, 2003b]. В связи с этим задачей наших исследований явился сравнительный протеомный анализ клеток вегетативных и некультивируемых форм микоплазм *A. laidlawii* PG8, *M. gallisepticum* S6 и *M. hominis* PG37.

Данные протеомных исследований клеток *A. laidlawii* PG8, образующихся в РУС, представлены на рисунках 28, 30, 32, в таблицах 10, 11, 12.

Как известно, не все белки можно выявить с помощью протеомного подхода. Так, не все клеточные белки экспрессируются в данное время; 2-D разделение белков в геле эффективно только для малых организмов; белковые молекулы, представленные

небольшим числом копий, могут быть потеряны из-за низкой разрешающей способности двумерного электрофореза в геле; кроме того гидрофобные мембранные белки, очень щелочные или кислые белки, очень большие или маленькие белки обычно не разделяются в 2-DE [Renzone *et al.*, 2005; Völker, Hecker, 2005]. Регистрируемое с помощью 2-DE у *A. laidlawii* PG8 количество белковых пятен (270-440) является сравнительно высоким для анализа экспрессии белков растворимой фракции у бактерий [Wasinger *et al.*, 2000].

В результате двумерного разделения дифференциально окрашенных флуоресцентными красителями белков клеток *A. laidlawii* PG8, образующихся в клетках вегетативных и некультивируемых форм, нами были выявлены количественные и качественные различия в пуле растворимых белков у микоплазмы в РУС.

В стрессовых условиях у микоплазмы регистрировались количественные и качественные изменения в составе изоформ, связанные со смещением в кислую область относительно белка контрольных клеток, и наблюдалась модуляция уровня экспрессии белков. Образование изоформ, вероятно, является следствием посттрансляционной модификации этих белков и может быть универсальной защитной реакцией бактерий, способствующей оптимизации катализа реакций и клеточных процессов микроорганизмов в НУС [Хочачка, Сомеро, 1988; Len *et al.*, 2004; Skiba *et al.*, 2008].

В случае изменения субстрата был идентифицирован 61 дифференциально экспрессированный белок (рис. 28). Выявленные стресс-реактивные белки, согласно функциональным категориям COG, участвуют в репликации (4), транскрипции (5), трансляции (12), энергообразовании и метаболизме углеводов (16), нуклеотидов (5) и аминокислот (1), а также вирулентности (17) (табл.10).

Результаты анализа изменений экспрессии белков *A. laidlawii* PG8 свидетельствуют, что при изменении субстрата усиливается экспрессия белков, определяющих энергообразование, транспорт и метаболизм углеводов (Kba, GAPDH, PdhA, PdhB (2 изоформы), PdhD (2 изоформы), ACL_0205 (2 изоформы), ACL_0661), нуклеотидов (Rnr, Stpk, DeoA), а также участвующих в защитных механизмах (GroEL, Hsp20 (2 изоформы), ClpB (3 изоформы), Lon, SodA, AAD (3 изоформы), GlyA) и вирулентности (GroEL, Hsp20 (2 изоформы), ClpB (3 изоформы), Lon, SodA, Kba, GAPDH, PdhB (2 изоформы), PdhD (2 изоформы)), но снижается уровень экспрессии белков, участвующих в репликации (ParE, GyrB, LigA, UvrA), транскрипции (RpoB, Tex, GreA) и трансляции (EF-G, RpsA, RpsF, RpsF, RplL, GlnRS, ProRS, GlyRS, SerRS, PheRS, AspRS, HisRS).

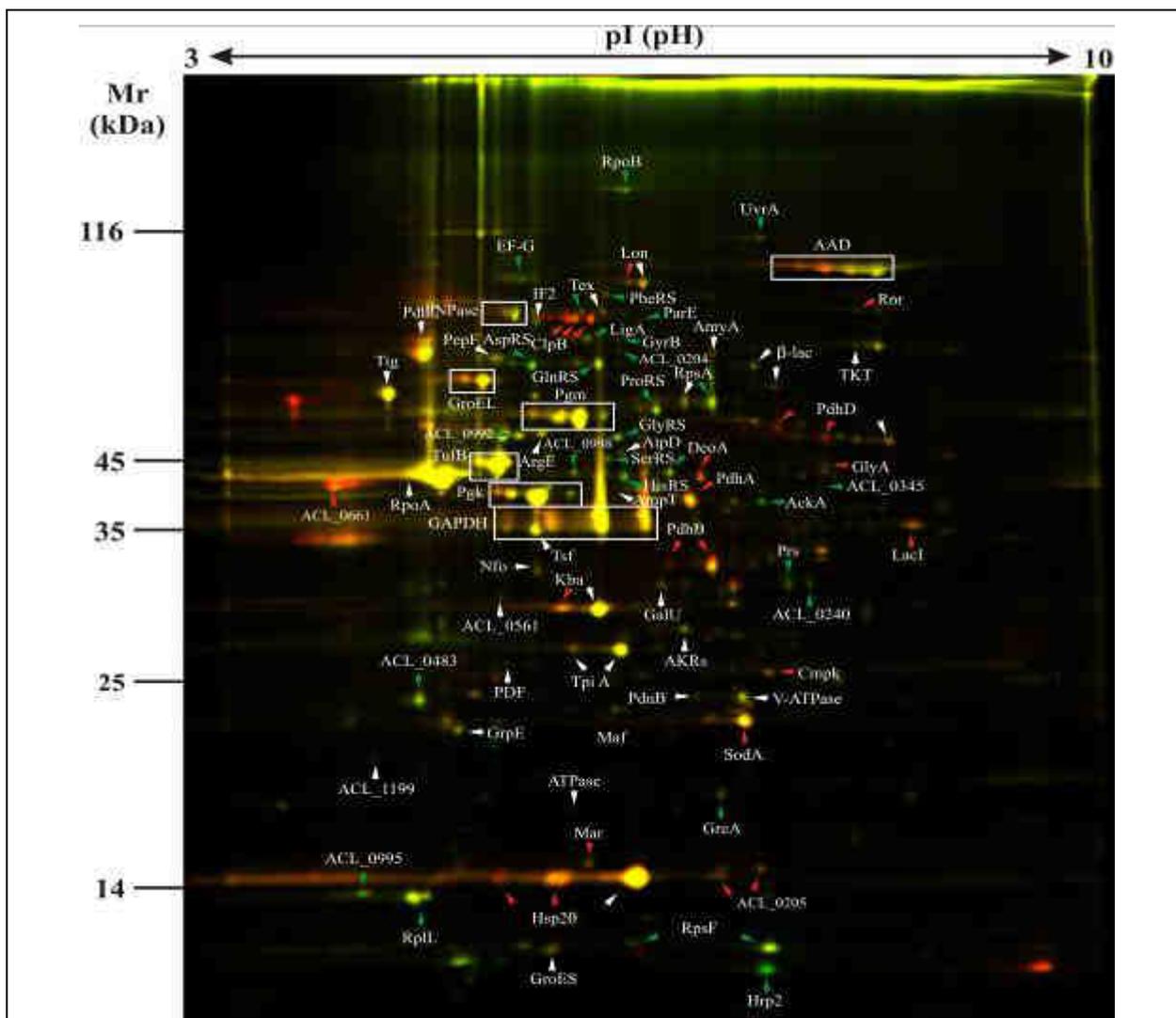


Рис. 28. 2D-электрофореграмма растворимых белков клеток контрольной (●) и опытной (●) культур *A.laidlawii* PG8. Стрелками обозначены дифференциально экспрессированные белки микоплазмы; в прямоугольники заключены изоформы белков.

Таблица 10

Дифференциально экспрессированные растворимые белки клеток вегетативных и некультивируемых форм *A. laidlawii* PG8.

№	COG ¹	Название белка ²	№ NCBI ³	Score ⁴	% перекрытия	Теорет. Mr/pI ⁵	Экспер Mr/pI ⁶	Дифференциальная экспрессия ⁷
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Репликация, рекомбинация и репарация	ДНК топоизомераза IV, субъединица В (ParE)	gi 162447245	302	25	72936/5,78	80144/5,78	1,6
2		ДНК топоизомераза, субъединица В (GyrB)	gi 162446893	142	19	71171/5,61	72674/5,71	1,8
3		ДНК лигаза (LigA)	gi 162448184	81	14	73963/5,67	72674/5,59	2
4		Экцизионная нуклеаза ABC, субъединица А (UvrA)	gi 162448183	61	12	105008/6,21	111518/6,29	1,6
5	Транскрипция	<u>β-субъединица РНК-полимеразы (RpoB)</u>	gi 162447041	302	25	141351/5,71	129944/5,73	1,5
6		Транскрипционный	gi 1624	140	66	14582/	15218/	1,5

		регулятор, MarR-семейство (Mar)	47905			4,96	5,59	
7		Транскрипционный вспомогательный фактор Тех (Tex)	gi 162448175	272	43	81687/5,67	83630/5,57	1,5
8		Транскрипционный регулятор, LacI семейство (LacI)	gi 162448029	99	21	36678/6,86	39177/6,86	1,9
9		Фактор элонгации транскрипции (GreA)	gi 162447758	231	65	17715/5,99	17627/6,20	1,5
10	Трансляция	<u>Фактор элонгации G (EF-G)</u>	gi 162447164	406	50	76287/5,29	95582/5,33	1,5
11		Рибосомный белок S1 (RpsA)	gi 162447732	216	27	54069/6,07	56862/6,18	1,5
12		Рибосомный белок S6 (RpsF)	gi 162447063	76	35	10777/6,60	12400/5,76	1,7
13		Рибосомный белок S6 (RpsF)	gi 162447063	76	35	10777/6,60	12218/6,31	1,5
14		Рибосомный белок L7/L12 (RplL)	gi 162447039	92	37	13091/4,86	13991/4,87	1,7
15		Глутаминил-тРНК-синтетаза (GlnRS)	gi 162448188	291	44	62840/5,58	64686/5,63	1,5
16		<u>Пролин-тРНК-синтетаза (ProRS)</u>	gi 162447162	245	40	54218/5,82	55600/5,86	1,6
17		<u>Глицил-тРНК-синтетаза, класс II (GlyRS)</u>	gi 162447800	119	21	53116/5,60	50300/5,70	1,5
18		Серин-тРНК-синтетаза (SerRS)	gi 162446896	81	16	48233/5,65	46010/5,65	1,5
19		Фенилаланил-тРНК-синтетаза (PheRS)	gi 162447120	292	38	87473/5,64	89606/5,65	1,5
20		Аспартил-тРНК-синтетаза (AspRS)	gi 162447681	411	59	65376/5,37	64433/5,38	3,4
21		Гистидил-тРНК-синтетаза (HisRS)	gi 162447682	296	60	48211/5,69	43861/5,72	2,4
22	Защитные механизмы	Белок теплового шока - 60 (GroEL)	gi 162448090	173		58231/5,17	61657/5,10	2
23		Белок теплового шока Hsp20 (Hsp20)	gi 162447286	136	32	16044/5,69	14718/5,25	2,1
24	Защитные механизмы	Белок теплового шока Hsp20 (Hsp20)	gi 162447286	126	70	16044/5,69	14673/5,48	1,7
25		Эндопептидаза Clp (ClpB)	gi 162447977	183	27	80199/5,58	80144/5,55	7,2
26		Эндопептидаза Clp (ClpB)	gi 162447977	111	23	80199/5,58	80642/5,50	2,3
27		Эндопептидаза Clp (ClpB)	gi 162447977	381	55	80057/5,58	80144/5,60	4,4
28		Эндопептидаза La (Lon)	gi 162447398	324	39	86710/5,76	94088/5,74	1,5
29		Супероксид-дисмутаза, Fe/Mn (SodA)	gi 162447168	110	59	22826/6,18	21874/6,25	1,5
30		Альдегид-, алкоголь-дегидрогеназа (AAD)	gi 162447047	198	21	95048/6,80	101060/6,33	2,4
31		Альдегид-, алкоголь-дегидрогеназа (AAD)	gi 162447047	245	27	95048/6,80	100562/6,44	2
32		Альдегид-, алкоголь-дегидрогеназа (AAD)	gi 162448230	242	27	95048/6,80	100064/6,54	2
33		<u>Серин-гидрокси-метилтрансфераза (GlyA)</u>	gi 162446933	175	24	45296/7,18	45000/6,50	1,5
34		Пептидаза, семейство U32 (ACL_0345)	gi 162447211	317	58	44890/6,48	42848/6,52	1,6
35	Энергообразова-	Кетозо-бисфосфат-	gi 1624	246	69	30391/	31098/	1,6

	ние / транспорт и метаболизм	альдолаза, класс-II (Kba)	48230			5,47	5,50	
36	углеводов	<u>Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH)</u>	gi 162448019	128	30	35648/5,78	39684/5,79	1,5
37		Фосфоглицераткиназа (Pgc)	gi 162448052	290	62	42741/5,43	41835/5,42	2
38		Фосфоглицераткиназа (Pgc)	gi 162448052	310	63	42741/5,43	42089/5,53	1,5
39		Фосфоглицератмутаза (Pgm)	gi 162447265	323	62	55799/5,58	54590/5,64	1,5
40		<u>Пируватдегидрогеназа E1, α-субъединица (PdhA)</u>	gi 162448151	134	26	40843/5,82	41456/6,07	1,6
41		<u>Пируватдегидрогеназа E1, β-субъединица (PdhB)</u>	gi 162448150	123	32	35660/6,04	35380/5,94	2,5
42		<u>Пируватдегидрогеназа E1, β-субъединица (PdhB)</u>	gi 162448150	173	47	35660/6,04	35127/6,18	1,7
43		Дигидролипоамид-дегидрогеназа (PdhD)	gi 162448148	68	9	49008/6,72	52571/6,32	4,6
44		Дигидролипоамид-дегидрогеназа (PdhD)	gi 162448148	107	24	49150/6,72	50300/6,54	2,3
45		<u>Ацетаткиназа (AckA)</u>	gi 162447358	86	22	42906/6,47	41329/6,29	2,5
46		Сахар-фосфат-изомеразы RpiB/LacA/LacB семейства (ACL_0205)	gi 162447075	88	34	16033/6,23	14809/6,20	1,5
47		Сахар-фосфат-изомеразы RpiB/LacA/LacB семейства (ACL_0205)	gi 162447075	213	62	16033/6,29	14991/6,32	1,5
48	Энергообразование / транспорт и метаболизм углеводов	Транспортная система ABC-типа, лиганд-связывающий компонент (ACL_0661)	gi 162447521	245	16	48485/4,64	42975/4,43	5
49		Фосфотрансферазная система, фосфопереносящий белок (Hpr2)	gi 162448050	105	61	8546/7,98	11491/6,3	6,4
50		Гипотетический белок (ACL_0240)	gi 162447110	148	39	35467/6,42	33537/6,48	1,8
51	Транспорт и метаболизм аминокислот	Пептидаза M20B, пептидаза T (ACL_0998)	gi 162447852	298	67	45592/5,47	44241/5,54	1,6
52	Транспорт и метаболизм нуклеотидов	Рибозофосфатдифосфокиназа (Prs)	gi 162446905	80	22	34894/6,33	33415/6,37	1,5
53		Рибонуклеозид-трифосфатредуктаза (Rnr)	gi 162448132	213	28	86417/6,85	83630/6,66	1,5
54		Цитидилаткиназа (Cmpk)	gi 162447733	221	55	25105/6,24	25122/6,30	1,5
55		Тимидинфосфорилаза (DeoA)	gi 162447543	302	51	46563/5,98	44241/5,94	1,5
56		Тимидинфосфорилаза (DeoA)	gi 162447543	281	56	46563/5,98	43861/6,15	2,6
57	Механизмы сигнальной трансдукции	ГТФаза TurA/VipA типа (ACL_0204)	gi 162447074	201	26	67777/5,62	68192/5,71	3,6
58	Гипотетические белки	Аденозинтрифосфатаза (ATPase)	gi 162448193	121	45	16713/5,35	17127/5,54	2
59		Цинковая протеаза (ACL_0992)	gi 162447846	255	47	50277/5,25	50552/5,33	1,6

60	Гипотетический белок (ACL_0483)	gi 162447346	109	45	24365/4,98	23263/4,88	1,5
61	Гипотетический белок (ACL_0995)	gi 162447849	84	36	14217/4,60	14127/4,61	1,6

¹Классификация белков по функциональным категориям указана согласно COG; ²идентифицированный белок *A. laidlawii*; ³идентификационный номер белка в базе NCBI; ⁴достоверность поиска белков (Score) в базе данных NCBI с использованием программы Mascot, нд – нет данных; ⁵молекулярная масса белка в Да и рI, определенные в эксперименте; ⁶теоретическая молекулярная масса белка в Да и рI из базы данных; ⁷цифры (жирный или обычный шрифт) обозначают кратность изменения экспрессии белка (увеличение или уменьшение соответственно); ■ – факторы вирулентности; «_» – белки, ассоциированные с мембранными везикулами у грамположительных бактерий [Lee *et al.*, 2009].

Значительные ($\geq 4,4$) изменения экспрессии были обнаружены для 2-х изоформ **ClpB** (казеинолитическая пептидаза В – молекулярный шаперон, вовлеченный в ресолюбилизацию белковых агрегатов и необходимый для выживания клетки во время теплового стресса [Doyle *et al.*, 2007; Shih, Lai, 2007]), **PdhD** (дигидролипоамид-дегидрогеназа – компонент пируватдегидрогеназного комплекса, катализирующий реокисление дигидролипоевых групп [Lindsay *et al.*, 2000]), а также **ACL_0661** (лиганд-связывающий компонент транспортной системы ABC-типа) и **Hpr2** (фосфопереносящий белок фосфоенолпируват-сахар-фосфотрансферазной системы бактерий [Azuaga *et al.*, 2005]).

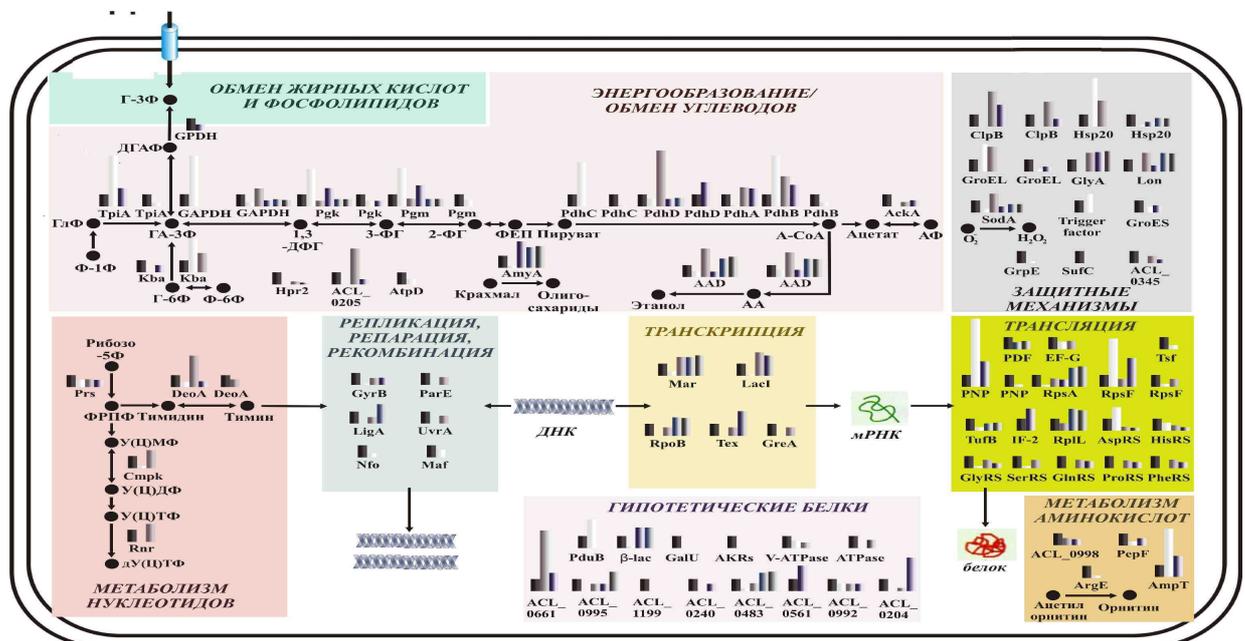


Рис. 29. Возможное участие идентифицированных стресс-реактивных белков *A. laidlawii* PG8 в клеточных процессах микоплазмы в РУС.

Ф-1Ф – фруктозо-1-фосфат; ГлФ – глицеролфосфат; Г-6Ф – глюкозо-6-фосфат; Ф-6Ф – фруктозо-6-фосфат; Ф-1,6Ф – фруктозо-1,6-бифосфат; ГА-3Ф – глицеральдегид-3-фосфат; 1,3-ДФГ – 1,3-дифосфоглицерат; 3-ФГ – 3-фосфоглицерат; 2-ФГ – 2-фосфоглицерат; ФЕП – фосфоенолпируват; А-СоА – ацетил-коэнзим А; АцетилФ – АцетилФ – ацетилфосфат; Рибозо-5Ф – рибозо-5-фосфат; ФРПФ – фосфорибозилпирофосфат; O_2 – супероксидный анион; H_2O_2 – перекись водорода.

Возможное участие выявленных нами стресс-реактивных белков *A. laidlawii* PG8 в клеточных процессах микоплазмы представлено на рис. 29. Очевидно, что определение полной картины биохимических процессов клеток *A. laidlawii* PG8 при адаптации к РУС предполагает сравнительное геномно-транскриптомно-протеомное профилирование, а также электронную томографию клеток микоплазмы, образующихся в РУС, и верификацию каждого продукта гена в отношении его функциональной активности. Некоторые (~ 18 %) из выявленных нами белков, дифференциально-экспрессированных у *A. laidlawii* PG8 в РУС, были обнаружены в составе мембранных везикул у ближайших родственников микоплазм – грамположительных бактерий [Lee *et al.*, 2009]. Не исключено, что зарегистрированные нами существенные изменения уровня экспрессии некоторых из этих белков (RpoB, TufB, EF-G, IF-2, ProRS, GlyRS, GlyA, GAPDH, PdhA, PdhB, AskA, PepF, β -lac) при длительном культивировании *A. laidlawii* PG8 в стрессовых условиях и достоверное увеличение количества НФ в соответствующих культурах микоплазмы – взаимосвязанные процессы.

Полипептидные спектры – результаты разделения методом двумерного электрофореза дифференциально окрашенных белков ВФ и НФ клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях, представлены на рис. 30. Дифференциальное окрашивание цианинами – флюоресцентными красителями – позволяет проводить относительную оценку экспрессии отдельных белков одновременно в двух образцах. Для этого каждый образец окрашивается красным или зеленым флюоресцентным красителем, а после смешивания образцов в эквимольном соотношении проводится двумерное разделение одновременно обоих образцов в одном геле, что позволяет избежать технических ошибок, связанных с разным уровнем окрашивания разных гелей серебром или другими красителями. Если количество белка в исследуемых образцах относительно одинаково, то пятно будет окрашено желтым цветом. Окрашивание белкового пятна зеленым или красным цветом свидетельствует об относительном изменении уровня экспрессии.

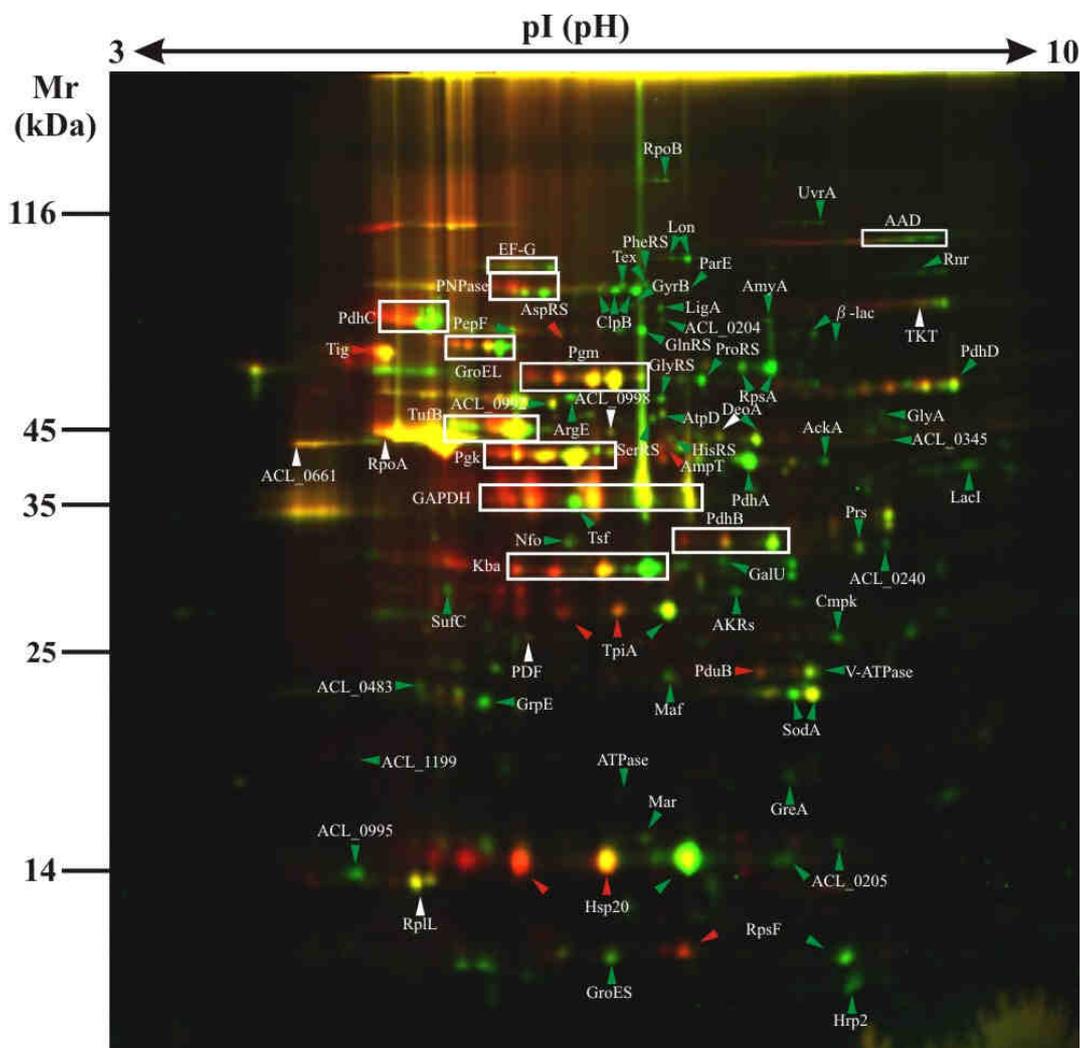


Рис.30. 2D-электрофореграмма растворимых белков вегетивной (●) и некультивируемых (●) культур форм клеток *M. gallisepticum* S6.

Стрелками обозначены дифференциально экспрессированные белки микоплазмы; ▲ или ▲ – экспрессия повышена у вегетивной или некультивируемой форм культуры соответственно; □ – изоформы белков.

В геноме *M. gallisepticum* R_{low} предсказано наличие 726 ОРС, способных кодировать полипептиды [Parazisi *et al.*, 2003]. В наших исследованиях было визуализировано 161 и 130 индивидуальных белковых пятен ВФ и НФ клеток *M. gallisepticum* S6, соответственно, что в значительной мере согласуется с данными для ВФ *M. genitalium* на стационарной фазе роста [Wasinger *et al.*, 2000] и бактерий в НС [Oliver, 2005], свидетельствующих о существенной редукции экспрессии белков в клетках бактерий при адаптации их к НУ среды. 62 и 46 полипептидов для ВФ и НФ *M. gallisepticum* S6, соответственно, были идентифицированы.

В результате сравнительного анализа данных было установлено, что адаптация *M. gallisepticum* S6 к НУ сопровождается существенным изменением белковой экспрессии в клетках микоплазмы (табл. 11). Различия в количественном и качественном составе полипептидных пулов ВФ и НФ *M. gallisepticum* S6 связано как с редукцией, так и индукцией экспрессии продуктов ряда генов, накоплением полипептидов (MGC3, PstS, ch_1066, ch_1080 (N-конец), uh_1572) и появлением изоформ 17 белков (AcoA, AcoB, DnaK, Prgk, PtsA, PutA, PycF, RpoA, Smc-like, Tsf, TufB, VlhA 3.03, PvpA, MGC3, MALLP, GAPDH, uh_1579) в НФ клеток микоплазмы. При этом была зарегистрирована отчетливая тенденция к смещению значительного количества белков НФ клеток *M. gallisepticum* S6 в кислую область (снижение изоэлектрической точки) относительно белка-предшественника.

Таблица 11

Дифференциально экспрессированные растворимые белки клеток вегетативных и некультивируемых форм *M. gallisepticum* S6

Функциональ-ная категория и обозначение белка	Название белка	Локус ОРС на хромосо-ме	Наличие белка в клетках мико-плазмы
1	2	3	4
Трансляция			
50S rp L7/L12	Рибосомный белок L7/L12	MGA_0874	+
TufB	Фактор элонгации Tu	MGA_1033	↑↑ *
Tsf	Фактор элонгации Ts	MGA_0782	↓ *
EF-G	Фактор элонгации G	MGA_0260	–
ThrS	Треонил-тРНК-синтетаза	MGA_0925	+
Транскрипция			
RpoA	α-субъединица РНК-полимеразы	MGA_0443	+ *
GreA	Фактор элонгации GreA	MGA_0958	–
NusA	Фактор элонгации NusA	MGA_0818	–
Посттрансляционные модификации, обмен белков, шапероны			
DnaK	Белок теплового шока	MGA_0279	+ *
GroES/Hsp10	Белок теплового шока	MGA_0153	+
DnaJ	Ко-шаперон белка теплового шока DnaK	MGA_1324d	–
GrpE	Ко-шаперон белка теплового шока DnaK	MGA_1232	↓
OsmC	Индукцируемый осмотическим шоком белок	MGA_1142	+
Клеточная адгезия			
PvpA	Фазовариабельный белок А	MGAL_0256_0258	↑↑ *
MGC3	Цитоадгезин 3 <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	MGA_0939	↑ *
MALLP	Подобный макрофаг-активирующему липопротеину	MGA_0398	↑↑ *

VlhA 3.03	Предшественник гемагглютинина VlhA 3.03	MGA_0380	↑↑ *
Энергетический метаболизм			
AceF	Дигидролипоамидацетилтрансфераза	MGA_0162	+
AcoA	α-субъединица пируватдегидрогеназы	MGA_0165	+ *
AcoB	β-субъединица пируватдегидрогеназы	MGA_0164	+ *
Fba	Фруктозобифосфат-альдолаза	MGA_0498	↓
PfkA	6-фосфофруктокиназа	MGA_0157	+
Pgk	Фосфоглицераткиназа	MGA_1187	+ *
TriA	Триозофосфатизомераза	MGA_0357	+
PutA	Альдегид-дегидрогеназа (NAD ⁺)	MGA_0860	+ *
PtsA	Фосфоенолпируват-белок-киназа	MGA_0508	+ *
PycF	Пируваткиназа	MGA_0156	↓ *
GAPDH	Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа	MGA_0330	+
Pta	Фосфотрансацетилаза	MGA_0432	+
Биосинтез кофакторов и простетических групп			
TrxA	Тиолдисульфидизомераза	MGA_0452	↑↑
TrxA	Тиоредоксин	MGA_0774	+
Транспорт			
PstS	Переносчик фосфатов	MGA_0687	↑
Метаболизм нуклеотидов			
NrdI	Рибонуклеотидредуктаза-стимулирующий-белок	MGA_0696	+
Промежуточный метаболизм			
Ppa	Пирофосфатаза неорганическая	MGA_1121	+
GTPase	Гипотетическая ГТФаза	MGA_0500	-
PTC1	Серин/треониновая фосфатаза	MGA_0461	↑↑
Регуляция клеточного цикла			
Smc-like	Подобный белку поддержания структуры хромосом	MGA_0917	+ *
Консервативные белки			
ch_1209	Консерв. гипот. белок	MGA_0902	+
ch_1220	Консерв. гипот. белок	MGA_0922	+
ch_1450	Консерв. гипот. белок	MGA_0030	+
ch_1455	Консерв. гипот. белок	MGA_0042	+
ch_1608	Консерв. гипот. белок	MGA_0321	+
ch_1080	Консерв. гипот. белок	MGA_0674	-
ch_1190	Консерв. гипот. белок	MGA_0868	-
ch_1200	Консерв. гипот. белок	MGA_0879	-
ch_1301	Консерв. гипот. белок	MGA_1083	-
ch_1316	Консерв. гипот. белок	MGA_1110	-
ch_1369	Консерв. гипот. белок	MGA_1199	-
ch_1371	Консерв. гипот. белок	MGA_1208	-
ch_1381	Консерв. гипот. белок	MGA_1224	-

ch_1510	Консерв. гипот. белок	MGA_0123	–
ch_1566	Консерв. гипот. белок	MGA_0226	–
ch_1601	Консерв. гипот. белок	MGA_0306	–
ch_1660	Консерв. гипот. белок	MGA_0416	–
ch_1670	Консерв. гипот. белок	MGA_0431	–
ch_1709	Консерв. гипот. белок	MGA_0495	–
ch_1066	Консерв. гипот. белок	MGA_0649	↑
ch_1080	Консерв. гипот. белок (N-конец)	MGA_0674	↑
Уникальные белки			
uh_1050	Уник. гипот. белок	MGA_0621	+
uh_1192	Уник. гипот. белок	MGA_0870	+
uh_1215	Уник. гипот. белок	MGA_0913	+
uh_1579	Уник. гипот. белок	MGA_0252	+ *
uh_1572	Уник. гипот. белок	MGA_0241	↑

- ↑↑ – белковая экспрессия у НФ микоплазмы более выражена, чем у ВФ;
 ↑ – экспрессирован у НФ микоплазмы, но не экспрессирован у ВФ;
 – – не экспрессирован у НФ микоплазмы, но экспрессирован у ВФ;
 ↓ – белковая экспрессия у НФ микоплазмы менее выражена, чем у ВФ;
 + – белковая экспрессия относительно равная у ВФ и НФ;
 * – экспрессированный белок представлен изоформами у НФ.

Консерв. гипот. белок - консервативный гипотетический белок.

Уник. гипот. белок - уникальный гипотетический белок.

Обозначения белков и локусов генов приведены согласно последовательности генома *M. gallisepticum* R (**GenBank**: # NC_004829).

Всего в результате сравнительного анализа полипептидных спектров ВФ и НФ *M. gallisepticum* S6 было идентифицировано 63 белка, участвующие в адаптации клеток микоплазмы к НУ. При этом в НФ клеток *M. gallisepticum* S6 нами было обнаружено чрезвычайно высокое разнообразие изоформ адгезинов (в том числе PvrA), отличающихся не только по рН, но и по массе (рис. 18, табл. 7). Выраженная экспрессия белков адгезии наблюдалась в клетках *M. genitalium* в стационарной фазе роста [Wasinger *et al.*, 2000], а также *M. gallisepticum* R_{low} [Cecchini *et al.*, 2007], при культивировании микоплазмы с эукариотическими клетками. Однако в отношении изоформ адгезинов этих микоплазм в работах авторов упоминания нет. Появление широкого спектра молекул адгезии у микоплазм может быть универсальной защитной реакцией, связанной с усилением адгезии бактерий к клеткам хозяина под действием стрессовых факторов [Wasinger *et al.*, 2000].

Функции значительного количества белков, экспрессия которых существенно изменяется в клетках микоплазм (*M. gallisepticum* S6, *M. gallisepticum* R_{low} и *M. genitalium*) при воздействии различных факторов, не установлена. Неидентифицированность функций

этих белков может отражать значимость их для неисследованного пока состояния микоплазм – выживания в НУ среды.

Результаты сравнительного анализа полипептидных спектров клеток *M. gallisepticum* S6 свидетельствуют, что в НФ микоплазмы содержится также повышенный уровень шаперона DnaK. При НУ среды этот белок, вероятно, способствует увеличению времени жизни белковых молекул [Schröder *et al.*, 1993].

Образование изоферментов, участвующих в энергетическом метаболизме НФ клеток микоплазмы (табл. 11), может быть связано с изменениями в клетках бактерий, направленными на оптимизацию катализа реакций [Хочачка, Сомеро, 1988]. Особенности спектра изоформ могут отражать уникальность реорганизации биохимических процессов у разных бактерий. Функциональный смысл изоформизма соответствующих белков у *M. gallisepticum* S6 еще предстоит выяснить.

На основании полученных экспериментальных данных и анализа их *in silico* нами была составлена схема возможных перестроек метаболических путей в клетках *M. gallisepticum* S6 при адаптации к НУ (рис. 31).

Полученные данные свидетельствуют, что в НФ клеток *M. gallisepticum* S6 сохраняется значительная часть ферментов гликолитического пути. При этом наличие изоформ соответствующих ферментов позволяет предполагать, что одним из путей, активирующихся в клетках *M. gallisepticum* S6 при культивировании их в НУ среды, является глюконеогенез. Неуглеводными компонентами, определяющими функционирование этого пути, могут быть аминокислоты и, в меньшей степени, липиды, высвобождающиеся при лизисе части клеток популяции. Интенсификация глюконеогенеза обеспечивает синтез необходимого пула сахаров, в том числе для формирования капсулоподобных структур, выявленных нами при электронно-микроскопическом исследовании клеток *M. gallisepticum* S6. Капсулоподобные структуры могут способствовать выживанию клеток бактерий в НУ [Степанова и др., 2001].

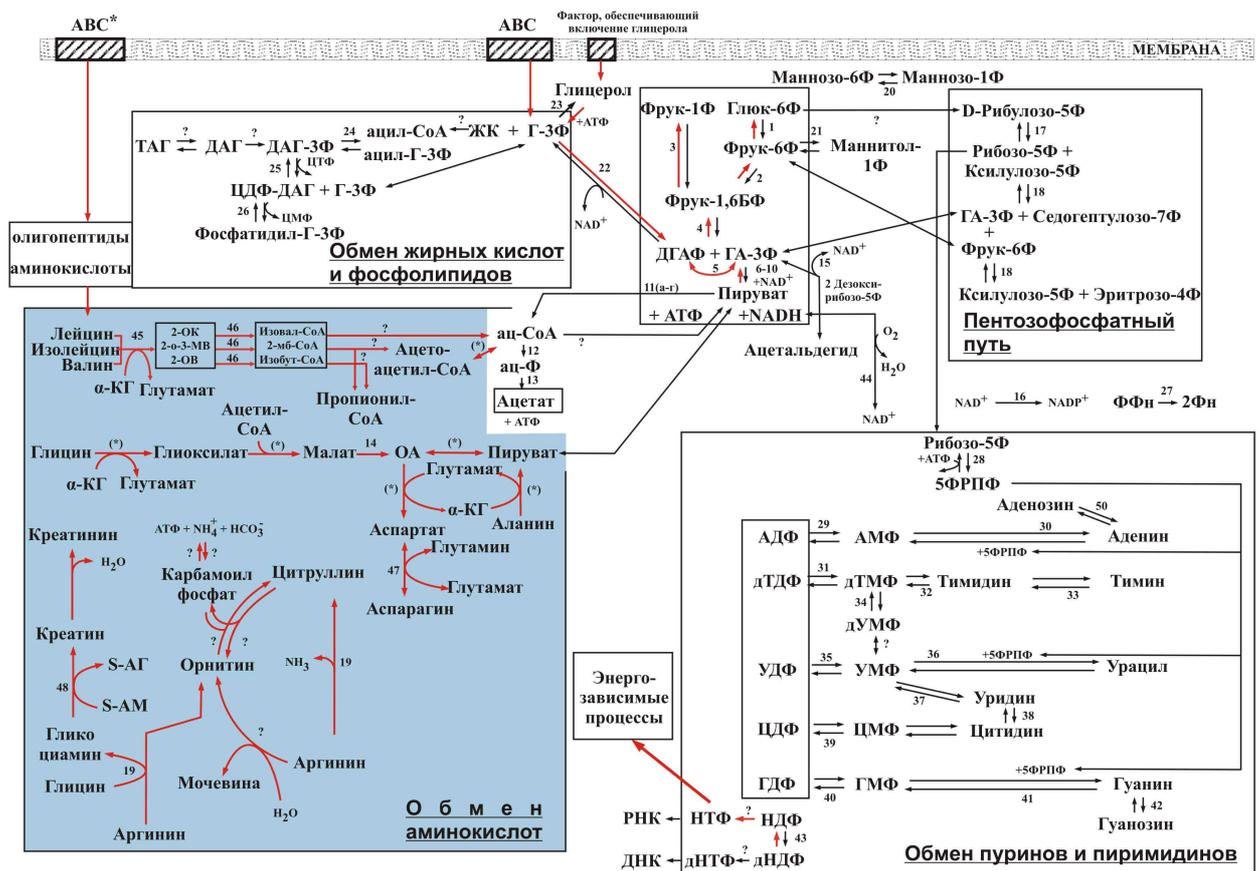


Рис. 31. Схема возможных перестроек метаболических путей в клетках *M. gallisepticum* S6 при образовании НФ.

ABC* – ABC-транспортная система для аминокислот и олигопептидов; PTS – фосфоенолпируват-углевод-трансферазная система; ТАГ – триацилглицерид; ДАГ – диацилглицерид; ДАГ-3Ф – диацилглицерол-3-фосфат; ацил-СоА – ацил-коэнзимА; ацил-Г-3Ф – ацилглицерол-3-фосфат; ЦДФ-ДАГ – цитидиндифосфат-диацилглицерол; Фосфатидил-Г-3Ф – фосфатидилглицерол-3-фосфат; Г-3Ф – глицеро-3-фосфат; NAD⁺ - никотинамидаденин-динуклеотид; ЖК – жирные кислоты; Фрук-1Ф – фруктозо-1-фосфат; Глюк-6Ф – глюкозо-6-фосфат; Фрук-1,6БФ – фруктозо-1,6-бифосфат; ДГАФ – дигидроксиацетонфосфат; ГА-3Ф – глицеральдегид-3-фосфат; 2'-дезоксирибозо-5Ф – 2'-дезоксирибозо-5-фосфат; NADH - никотинамидаденин-динуклеотид восстановленный; ац-СоА – ацетил-коэнзим А; ац-Ф – ацетилфосфат; ацетоацетил-СоА – ацетоацетил коэнзим А; NADP – никотинамиддинуклеотидфосфат; маннитол-1Ф – маннитол-1-фосфат; маннозо-6Ф – маннозо-6-фосфат; D-рибулозо-5Ф – D-рибулозо-5-фосфат; Седогептулозо-7Ф – седогептулозо-7-фосфат; Фрук-6Ф – фруктозо-6-фосфат; Эритрозо-4Ф – эритрозо-4-фосфат; Карбамоил-Ф – карбамоилфосфат; АДФ – аденозиндифосфат; АТФ – аденозинтрифосфат; ФФн – пиррофосфат неорганический; Фн – фосфат неорганический; Рибозо-5Ф – рибозо-5-фосфат; 5ФРПФ – 5-фосфорибозилпиррофосфат; АМФ – аденозинмонофосфат; дТДФ – дезокситимидиндифосфат; дТМФ – дезокситимидинмонофосфат; дУМФ – дезоксиуридинмонофосфат; УДФ – уридиндифосфат; УМФ – уридинмонофосфат; ЦДФ – цитидиндифосфат; ЦМФ – цитидинмонофосфат; ГДФ – гуанозиндифосфат; ГМФ – гуанозинмонофосфат; РНК – рибонуклеиновые кислоты; ДНК – дезоксирибонуклеиновые кислоты; НТФ – нуклеозидтрифосфат; НДФ – нуклеозиддифосфат; дНТФ – дезоксинуклеозидтрифосфат; дНДФ – дезоксинуклеозиддифосфат; ОА – оксалоацетат; α-КТ – α-кетоглутаровая кислота; S-АМ – S-аденозилметионин; S-АГ – S-аденозилгомоцистеин; 2-ОВ – 2-оксоизовалерат; 2-ОК – 2-оксоизокапроат; 2-о-3-МВ – 2-оксо-3-метилвалерат.

Конечными продуктами метаболизма НФ микоплазмы могут быть азотсодержащие соединения (мочевина и/или креатинин), образующиеся при деградации аминокислот. Однако в геноме *M. gallisepticum* R_{low} не было обнаружено специфических ферментов для образования мочевины, но были выявлены две ОРС, кодирующие аргининдезимиразу. В литературе есть данные, что превращения аргинина в орнитин и аргинина в цитруллин катализируют ферменты, имеющие сходную пространственную организацию [Murray-Rust *et al.*, 2001]. При этом механизм соответствующих реакций идентичен. В этой связи можно предположить, что последовательность реакций (в случае низкой субстратной специфичности), одним из продуктов которых является мочевина, в принципе, может протекать в клетках *M. gallisepticum* S6. Однако так ли это, еще предстоит выяснить.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о существенных биохимических, в том числе метаболических перестройках клеток *M. gallisepticum* S6 в НС, индуцированном НУ среды.

Адаптация *M. hominis* PG37 к стрессовым условиям также сопровождается ее переходом в некультивируемое состояние. 2D-электрофоретическое разделение в диапазоне рН 3–10 растворимой в буфере CHAPS фракции дифференциально окрашенных флуоресцентными красителями белков клеток *M. hominis* PG37, культивируемых в разных условиях, показало, что в условиях стресса в клетках бактерий изменяется белковый профиль. Выявлено 53 белка, уровень которых существенно различался в контроле и опыте. В результате масс-спектрометрического анализа эти белки были идентифицированы (рис. 32, таблица 12). Согласно функциональным категориям (clusters of orthologous groups of proteins – COG), 47 из 53 белков микоплазмы участвуют в ключевых процессах – трансляции (12; 22.64%), транскрипции (2; 3.77%), посттрансляционной модификации (7; 13.20%), регуляции клеточного цикла (2; 3.77%), образовании энергии (6; 11.32%), транспорте и метаболизме углеводов (3; 5.66%), аминокислот (8; 15.09%), нуклеотидов (6; 11.32%), неорганических ионов (1; 1.89%); функции шести белков (11.32%) не установлены.

На 2D-электрофореграммах опытных образцов отчетливо выражена тенденция к смещению значительного числа белков в область кислых значений рН, а также наблюдалось изменение спектра изоформ и их уровня. Образование изоформ можно рассматривать как универсальную защитную реакцию бактерий, способствующую оптимизации клеточных процессов в стрессовых условиях.

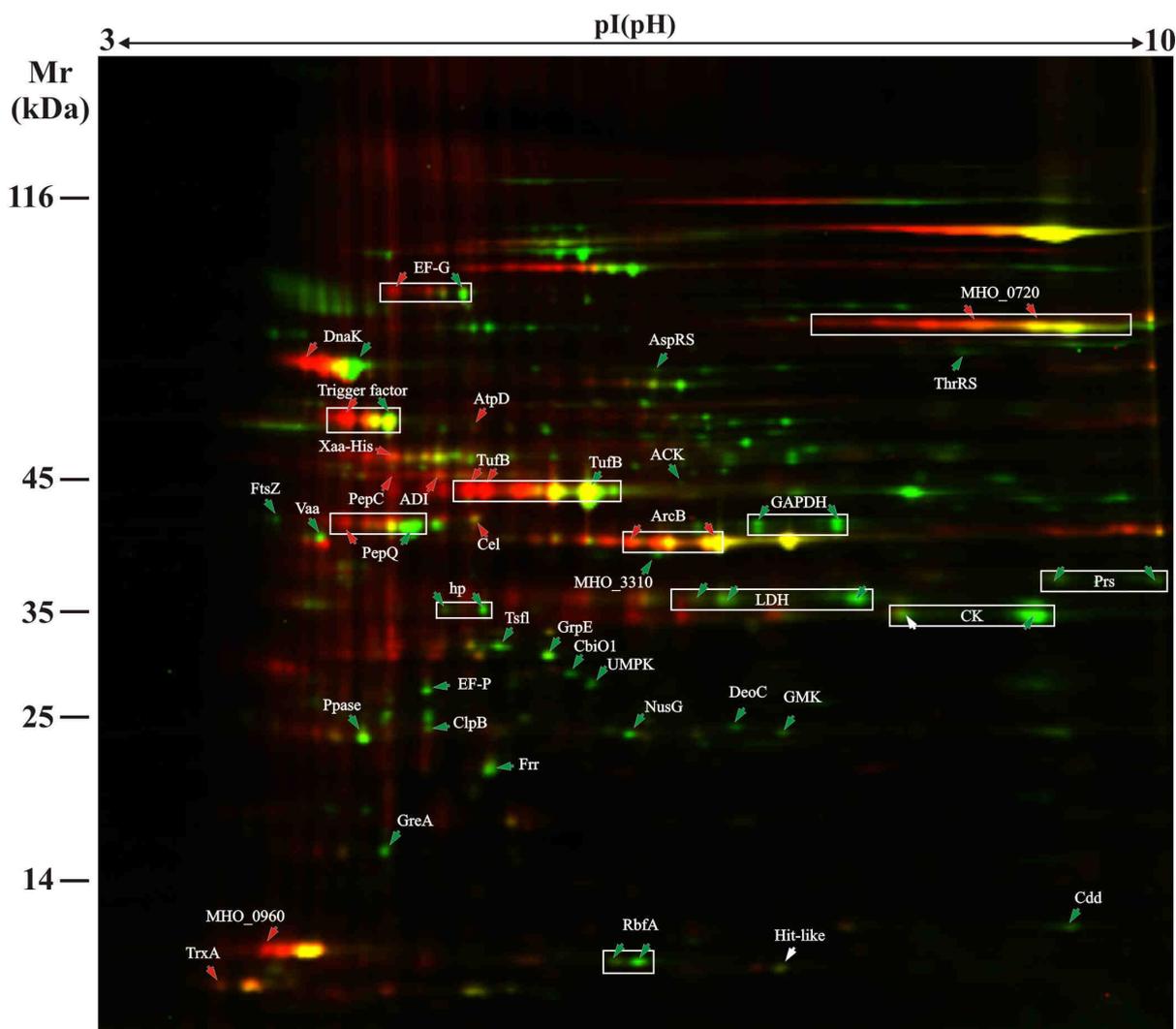


Рис. 32. 2D-электрофореграмма растворимых белков вегетативной (●) и некультивируемых (●) культур форм клеток *M. hominis* PG37
 Стрелками обозначены дифференциально экспрессированные белки микоплазмы; ▲ или ▼ – экспрессия повышена у вегетативной или некультивируемой форм культуры соответственно; □ – изоформы белков.

Изменения в уровне белков внутри функциональных групп носили разнонаправленный характер (табл. 12). Наблюдалось существенное изменение содержания белков, участвующих в метаболизме аргинина, ограниченное содержание которого в среде культивирования *M. hominis* PG37 определяет одно из условий стресса (ограничение источника энергии). Так, отмечено значительное повышение уровня аргининдезимины (ADI) и орнитин-карбамоилтрансферазы (ArcB) – ферментов, участвующих в реакциях аргининдегидролазного пути. Различия в содержании этих белков у *M. hominis* PG37 в контроле и опыте могут отражать особенности их регуляции в присутствии и в отсутствие свободного аргинина в окружающей среде. Аргинин –

основной источник энергии *M. hominis* – может поступать в клетки микоплазмы как в свободной, так и в связанной форме [Pereyre et al., 2009]. Показано, что при контаминации клеточных культур *M. hominis* активно извлекает аргинин из белков инфицированных клеток [Борхсениус и др., 2002]. В случае культивирования *M. hominis* PG37 на среде без специальной добавки аргинина возможен его импорт в клетки бактерии в связанной форме, источником аргинина при этом может быть триптоза (<http://www.himedialabs.ru/peptone-2>). Поскольку белки, участвующие в метаболизации аргинина, являются факторами вирулентности [Noh et al., 2002], изменение их содержания в клетках микоплазмы в стрессовых условиях представляет особый интерес. Сведения о вирулентных свойствах *M. hominis* основаны на изучении бактерии, культивируемой на средах, содержащих свободный аргинин [Hopfe, Henrich, 2008]. Очевидно, что полученные нами данные указывают на необходимость проведения сравнительного анализа вирулентных свойств микоплазм, выращенных на средах, содержащих и не содержащих свободный аргинин, для уточнения токсигенного потенциала бактерии.

Особый интерес для изучения механизмов адаптации представляет целлюлаза (Cel), количество которой у *M. hominis* возрастает в стрессовых условиях. Этот фермент распространен у фитопатогенных бактерий [Hu et al., 2007]. Вместе с тем он имеется и у некоторых бактерий, населяющих кишечный и урогенитальный тракты человека [Garland et al., 1987]. Показано, что повышение уровня целлюлазы в среде обуславливает увеличение количества лактобацилл [Ушакова и др., 2006] – основного фактора зубиоза кишечного и генитального трактов. Модуляция количества целлюлазы у *M. hominis* PG37 в разных условиях среды, вероятно, связана с общими сигнальными системами в микробиоценозах, обеспечивающих адаптацию бактерий и микроэкосистем к различным неблагоприятным факторам. В этой связи значительный интерес представляет регуляция экспрессии гена *cel*, а также синтеза и локализации его продукта у *M. hominis* в различных условиях среды.

Некоторые белки, изменение количественного содержания которых обнаружено нами у *M. hominis* PG37, участвуют в адаптации к голоданию других бактерий (например, TufB, Tsf, DnaK, AtpD у *Enterococcus faecalis*; TufB, Tsf, EF-G, DnaK, GrpE, AСК, GAPDH у *Bacillus subtilis*; TufB, Tsf, EF-G, RbfA, DnaK, ClpB, GrpE, Trigger factor, FtsZ, AСК, AtpD, LDH, GAPDH, PepQ, Cdd, DeoC у *Escherichia coli*; UMPK, GAPDH у *Staphylococcus aureus* COL; TufB, Tsf, EF-G, GreA, GrpE у *M. gallisepticum* S6 [Чернов и др., 2008; Heim et al., 2002; Bernhardt et al., 2003; Michalik et al., 2009; Tam et al., 2006; Han, Lee, 2006]). Однако в целом количественные и качественные изменения в пулах растворимых белков у разных бактерий при голодании существенно различаются, что отражает существование

универсальных и специфичных элементов фундаментальных механизмов адаптации различных микроорганизмов к стрессовым условиям.

На рис. 33 приведена схема возможного участия в клеточных процессах белков, содержание которых изменяется у *M. hominis* в стрессовых условиях. Однако выраженная мультифункциональность белков микоплазм, динамичность протеомов, ассоциированная как с изменением экспрессии генов, так и с участием белков в различных ассоциатах и их взаимоотношениями – интерактомами [Kuhner et al., 2009], вероятно, могут указывать на их участие в каких-то пока неизвестных процессах в клетках бактерий. Вместе с тем очевидно, что белки *M. hominis* PG37, содержание которых регулируется в неблагоприятных условиях среды, вовлечены в механизмы адаптации микоплазмы к стрессорам и служат потенциальными мишенями для контроля микоплазменных инфекций.

Согласно полученным нами данным, изменение белкового профиля у *M. hominis* PG37 в стрессовых условиях проявляется главным образом в снижении как общего количества белковых пятен, так и уровня индивидуальных белков. Это согласуется с результатами протеомных исследований, выполненных на других бактериях, в неблагоприятных условиях среды. Снижение количества белков при длительном пребывании бактерий в условиях стресса может быть следствием подавления белкового синтеза и перехода микроорганизмов в дормантное некультивируемое состояние.

Наблюдаемые изменения профиля белков в опыте у *M. hominis* PG37 могут быть обусловлены как особенностями их синтеза у микоплазмы в некультивируемом состоянии, так и протеолизом, а также переходом белков из цитоплазматической фракции в мембранную и их секрецией [Lee et al., 2009; Muela et al., 2008]. Так, значительное увеличение количества пептидилпролил-*цис-транс*-изомеразы FKBP-типа (trigger factor) – цитозольного шаперона эубактерий, вовлеченного в секрецию и постсекреторный фолдинг протеаз [Головлев, 2003; Wen et al., 2005], вероятно, связано с интенсификацией транспорта белков у микоплазмы в стрессовых условиях.

Из 53 белков *M. hominis* PG37, количества которых изменяется в стрессовых условиях, 24 белка (45.28%) относятся к факторам вирулентности, некоторые из них обнаруживаются в составе мембранных везикул у филогенетически близких микоплазмам грамположительных бактерий. Не исключено, что происходящие в стрессовых условиях существенные изменения количественного содержания белков, вовлеченных у *M. hominis* PG37 в вирулентность, связано с усилением их транспорта в составе мембранных везикул в пулах растворимых или ассоциированных с мембраной белков. Для проверки этого предположения потребуется субпротеомное профилирование *M. hominis* в оптимальных и

стрессовых условиях, определение белков МВ и особенностей их сортировки в различных условиях среды.

Таблица 12

Дифференциально экспрессированные растворимые белки клеток вегетативных и некультивируемых форм *M. hominis* PG37

№	Функциональная категория ¹	Белок ²	NCBI Acc.no	Score ³	Перекры- тие, %	Mascot Mr, (Da)/pI ⁴	Изменение количества ⁵
	Трансляция	Аспартил-тРНК-синтетаза (AspRS)	gi 269114962	164	27	65700/6.42	К
		Треонил-тРНК-синтетаза (ThrRS)	gi 269114879	262	39	68215/7.25	К
		Фактор элонгации P (EF-P)	gi 269114953	219	51	20429/5.36	3.97
		Фактор освобождения рибосомы (Frr)	gi 269115236	169	51	20995/5.58	2.41
		Фактор элонгации G (EF-G)	gi 269114921	131	22	77934/5.38	О
		Фактор элонгации G (EF-G)	gi 269114921	351	56	77934/5.38	3.33
		Рибосомсвязывающий фактор A (RbfA)	gi 269115302	86	55	13263/5.91	1.96
		Рибосомсвязывающий фактор A (RbfA)	gi 269115302	93	55	13263/5.91	3.91
		Фактор элонгации Ts (Tsf)	gi 269115276	212	46	33341/5.5	3.73
		Фактор элонгации Tu (TufB)	gi 269114826	169	36	43569/5.75	О
		Фактор элонгации Tu (TufB)	gi 269114826	236	55	43569/5.75	О
		Фактор элонгации Tu (TufB)	gi 269114826	317	76	43569/5.75	3.39
		Транскрипция	Фактор элонгации GreA (GreA)	gi 269114909	143	58	17535/5.2
	Фактор антитерминации транскрипции (NusG)		gi 269115174	184	56	22578/6.02	К
	Посттрансляционная модификация, обмен белков, шапероны	Белок теплового шока, шаперон Hsp100/ClpB, (ClpB)	gi 269114792	116	16	65582/5.15	1.64
		Белок теплового шока (DnaK)	gi 13431502	147	25	80998/5.82	О
		Белок теплового шока (DnaK)	gi 13431502	229	35	80998/5.82	2.21
		Кошаперон белка теплового шока DnaK (GrpE)	gi 269115183	288	66	30508/5.73	2.41
		Пептидилпролил-цис-транс-изомераза FKBP-типа (Trigger factor)	gi 269114865	181	28	54779/5.22	57.81

	Пептидилпролил- <i>цис-транс</i> -изомераза FKBP-типа (Trigger factor)	gi 269114865	457	64	54779/5.22	2.97
	Тиоредоксин (TrxA)	gi 269115190	121	62	11771/4.63	6.76
Регуляция клеточного цикла	Белок клеточного деления (FtsZ)	gi 18542434	191		40740/4.73	K
	Цитоадгезин (Vaa)	gi 2764639	262	57	39784/5.16	K
Энергообразование	Ацетаткиназа (ACK)	gi 269115159	254	54	45101/6.39	K
	H ⁺ -транспортирующая АТРаза F-типа, β-цепь (AtpD)	gi 269114800	138	30	54660/5.81	2.92
	L-лактатдегидрогеназа (LDH)	gi 269115133	140	30	35329/7.66	1.59
	L-лактатдегидрогеназа (LDH)	gi 269115133	168	41	35329/7.66	2.53
	L-лактатдегидрогеназа (LDH)	gi 269115133	218	57	35329/7.66	8.75
	Неорганическая пирофосфатаза (PPase)	gi 269114957	85	44	21156/5.1	2.56
Транспорт и метаболизм углеводов	Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH)	gi 6523351	166	57	29019/5.35	12.94
	Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH)	gi 6523351	167	63	29019/5.35	K
	Целлюлаза (Cel)	gi 269115173	286	72	39981/5.5	1.91
Транспорт и метаболизм аминокислот	Аргининдезиминая (ADI)	gi 728876	85	18	46284/5.52	5.88
	Орнитин-карбамоилтрансфераза, (ArgB)	gi 269114838	158	42	38295/6.2	5.19
	Орнитин-карбамоилтрансфераза, (ArgB)	gi 269114838	199	57	38295/6.2	1.61
	Карбаматкиназа (CK)	gi 269114837	154	51	32951/6.99	5.81
	Аминопептидаза C (PepC)	gi 269114809	109	30	51544/5.41	0
	ХАА-Pro-дипептидаза (PepQ)	gi 269114986	141	36	39209/5.27	0
	ХАА-Pro-дипептидаза (PepQ)	gi 269114986	177	54	39209/5.27	11.29
	Хаа-His-дипептидаза (Хаа-His)	gi 269115284	95	21	49431/5.47	7.35
Транспорт и метаболизм нуклеотидов	Цитидиндезаминаза (Cdd)	gi 269115032	70	48	14632/6.81	3.37
	Дезоксирибозофосфат-альдолаза (DeoC)	gi 269115108	212	62	24252/6.75	K
	Гуанилаткиназа (GMK)	gi 269115261	162	58	23903/6.47	4.01
	Уридилаткиназа (UMPК)	gi 269115235	193	56	27046/5.87	K
	Рибозофосфат-пирофосфокиназа (Prs)	gi 269115130	140	29	36023/8.19	2.93
	Рибозофосфат-пирофосфокиназа (Prs)	gi 269115130	152	33	36023/8.19	2.42
Транспорт и метаболизм неорганических	АТФ-связывающий белок импорта кобальта (CbiO1)	gi 269114971	201	43	29765/5.83	K

КИХ ИОНОВ						
Предсказана только общая функция	Консервативный гипотетический белок (МНО_3310)	gi 269115106	160	31	36031/6.05	26.85
Функция неизвестна	Гипотетический белок (МНО_0960)	gi 269114870	81	47	11360/4.58	O
Не классифицированы	Консервативный гипотетический белок (МНО_0720)	gi 269114846	91	12	77661/8.53	4.86
	Консервативный гипотетический белок (МНО_0720)	gi 269114846	123	21	77661/8.53	1.83
	Гипотетический белок (hp)	gi 20152569	100	40	34998/5.55	K
53	Гипотетический белок (hp)	gi 20152569	201	54	34998/5.55	K

Примечание: ¹Распределение белков по функциональным категориям (COG). ²Подчеркнуты белки, у грамположительных бактерий секретируемые в составе микровезикул [17], серым выделены факторы вирулентности. ³Достоверность поиска белков (score) в базе данных NCBI с использованием программы Mascot (<http://www.matrixscience.com>). ⁴Теоретическая молекулярная масса белка (кДа и рI) согласно базе данных. ⁵Кратность изменения количества белка (жирным показано увеличение количества, а обычным - уменьшение). К – обнаружен в контроле, но отсутствует в опыте; O – обнаружен в опыте, но отсутствует в контроле.

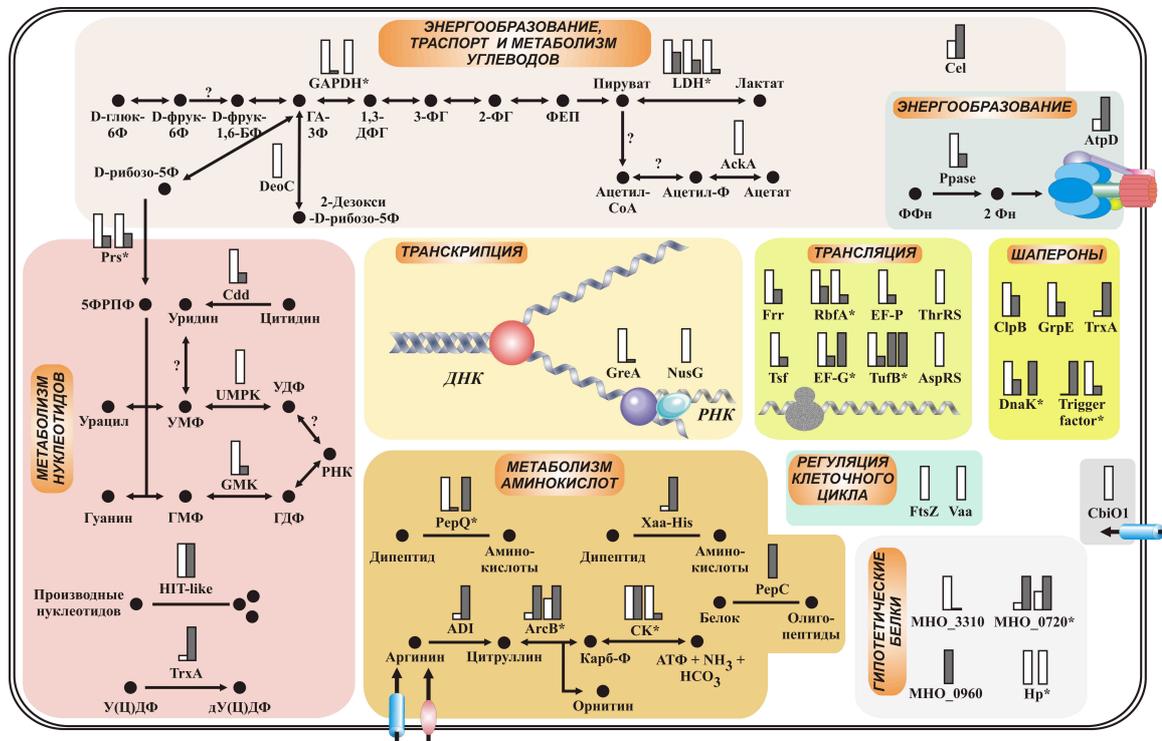


Рис. 33. Схема возможных перестроек метаболических путей в клетках при образовании НФ *M. hominis* PG37

D-глюк-6Ф – D-глюкозо-6-фосфат; D-фрук-6Ф – D-фруктозо-6-фосфат; D-фрук-1,6БФ – D-фруктозо-1,6-бифосфат; ГА-3Ф – глицеральдегид-3-фосфат; 1,3-ДФГ –

глицерат-1,3-дифосфат; 3-ФГ – 3-фосфоглицерат; 2-ФГ – 2-фосфоглицерат; ФЕП – фосфоенолпириват; Ацетил-СоА – ацетил-коэнзим А; АцетилФ – ацетилфосфат; D-рибозо-5Ф – D-рибозо-5-фосфат; 2-Дезокси-D-рибозо-5Ф – 2-Дезокси-D-рибозо-5-фосфат; 5ФРПФ – 5-фосфорибозилпирофосфат; UMP – уридинмонофосфат; UDP – уридиндифосфат; GMP – гуанозинмонофосфат; GDP – гуанозиндифосфат; U(C)DP – уридин(цитидин)дифосфат; dU(C)DP – дезоксиуридин(цитидин)дифосфат; P_{Pi} – пирофосфат неорганический; P_n – фосфат неорганический; Карбамоил-Ф – карбамоилфосфат; РНК – рибонуклеиновая кислота; □ – контроль, ■ – опыт, * изоформы белков; ? – отсутствие ферментов (и их генов), определяющих реакции.

Однако выраженная мультифункциональность белков микоплазм, динамичность их протеомов, ассоциирующая с количественными и качественными изменениями экспрессии генов, а также образованием белковых ассоциатов и их взаимоотношений – интерактомов, могут определять разнообразные перестройки клеток и молекулярной биологии микоплазмы, обеспечивающие выживание бактерии в РУС.

Выявленные нами стресс-реактивные белки микоплазм могут быть потенциальными мишенями для создания средств контроля персистенции микоплазм у эукариот, микоплазменных контаминаций клеточных культур и вакцинных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерии секретируют в окружающую среду широчайший спектр разнообразных веществ, многие из которых обладают токсическими свойствами, являющимися неотъемлемой составляющей факторов межвидовой борьбы, конкуренции за питательные вещества и места обитания. Секретируемые факторы токсигенности бактерий находят массовое применение в промышленности, сельском хозяйстве и медицине. Наиболее впечатляющим примером практического использования бактериальных токсинов являются антибиотики. Значительная часть токсигенных факторов бактерий представлена веществами белковой природы. Сегодня продолжается интенсивный поиск новых бактериальных соединений, имеющих токсический потенциал, как перспективных средств контроля патологических процессов.

В рамках настоящего проекта впервые осуществлены оригинальные исследования, обосновывающие терапевтический потенциал хорошо изученных микробных РНКаз, способы получения и первичную характеристику терапевтического потенциала менее изученных микробных протеиназ, а также определение еще не изученных токсигенных метаболитов микоплазм для оценки перспектив создания лекарственных средств на основе продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Основные этапы выполнения работ включали характеристику условий биосинтеза потенциально токсичных секретируемых метаболитов бактерий; выявление токсигенного потенциала секретируемых метаболитов бактерий; определение основных мишеней действия микробных гидролаз в клетках эукариот; оценку потенциального терапевтического потенциала микробных гидролаз – РНКаз и протеиназ, – и разработку способов направленной регуляции биосинтеза и токсических свойств микробных гидролаз и секретируемых метаболитов. В качестве продуцентов потенциальных токсических соединений белковой природы были выбраны бактерии рода *Bacillus*, секретирующие ряд гидролитических ферментов, участвующих в деградации белков и РНК, а также представители рода *Mycoplasma*, для которых практически отсутствуют сведения о секретируемых метаболитах.

Обобщая экспериментально полученные данные, можно выделить следующие основные блоки, включающие результаты исследований как биосинтетических процессов, так и биологической активности секретируемых факторов токсигенности бактерий.

1. Для бацилл – продуцентов секретируемых протеиназ:

- установлены общие и специфические способы регуляции биосинтеза сериновых протеиназ *B.intermedius*, определен сайт инициации трансляции в нуклеотидной последовательности гена субтилизиноподобной протеиназы *aprBi*;
- показано, что закономерности экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis* сохраняются на стадиях раннего и позднего стационара - индукция в присутствии ионов Ca^{2+} , неорганического фосфата и белковых субстратов. Установлены изменения в уровне экспрессии гена *apr Bi* в присутствии различных экзогенных факторов на разных стадиях роста (ионов Mg^{+2} и Mn^{+2} , белковых субстратов, сахаров). Экспрессия гена протеиназы контролируется катаболитной репрессией в начале стационарной фазы роста и не регулируется этим механизмом в поздней стационарной фазе роста рекомбинантного штамма;
- выявлено, что экспрессия гена глутамилэндопептидазы *B.intermedius* (*gse Bi*) в стационарной фазе роста активируется в присутствии в среде белковых субстратов, ионов кальция, неорганического фосфата и не контролируется катаболитной репрессией;
- получены приоритетные данные, что трансляция гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* (*apr Bi*) начинается с нестандартного стартового кодона GTG;
- определено, что в условиях *in vitro* протеиназа *B. intermedius* обладает тромболитической и антикоагулянтной активностью. Также сериновые протеиназы *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* обладают тромболитическими и антикоагулянтными свойствами, а также обладают коллагенолитической активностью. Эти данные делают возможным использование протеиназ как потенциальных тромболитических препаратов, а также их использование для локального применения с целью лизиса гематом или лечения воспаления суставов.

2. Для бацилл – продуцентов секретируемых рибонуклеаз:

- установлено, что синтез гуанилспецифичных рибонуклеаз бациллами начинается при снижении скорости роста культуры, максимальная активность ферментов наблюдается к началу стационарной фазы роста, при этом синтез РНКазы *B. intermedius* индуцируется при истощении неорганического фосфата в окружающей среде, а *B. amyloliquefaciens* продуцирует фермент, сходный по первичной структуре с биназой более чем на 90%, независимо от содержания фосфора. Экспрессия гена биназы в рекомбинантных штаммах *B.subtilis* находится под позитивным контролем основного регулятора метаболизма фосфора – белка PhoP, биосинтез же барназы его влиянию не подвержен. Ген барназы можно отнести к группе *Spo0A*-зависимых генов, активирующихся небольшими количествами фосфорилированного регулятора, в то время

как влияние Spo0A белка на экспрессию гена биназы косвенное и опосредовано белком AbrB;

- проведена оценка цитотоксичности микробных рибонуклеаз (рибонуклеазы *Bacillus intermedius*, биназы) по отношению к опухолевым клеткам, экспрессирующим маркерные онкогены kit и AML/ETO и показано, что присутствие двух онкогенов в клетке вызывает аддитивный эффект чувствительности к действию биназы на них. Кроме того, можно считать, что чем больше «испорчена» клетка, тем она более восприимчива к действию цитотоксичной РНКазы;

- по возрастанию в обработанных биназой предшественниках миелоидных клеток гидролитической активности гуанил-специфичных рибонуклеаз в отношении синтетического субстрата poly(I), гидролиз которого не характерен для внутриклеточных эукариотических рибонуклеаз, показано, что биназа проникает внутрь клеток;

- выявлено, что биназа снижает количество общей РНК в обработанных ею клетках, однако разрушение РНК как таковое при действии биназы на опухолевые клетки не является причиной смерти последних. Установлено, что механизм цитотоксического действия биназы на опухолевые клетки несущие онкогены *AML1-ETO* и *c-kit*, связан с индукцией апоптоза. Предполагается, что биназа вызывает цитотоксические эффекты либо напрямую, расщепляя мРНК, либо опосредованно, путем вмешательства продуктов гидролиза РНК в процесс РНК-интерференции; посредством продуктов их гидролиза.

- установлено, что при введении экспрессирующих каскад *AML1-ETO-shRNA* и *kit-shRNA*, направляющих экспрессию соответствующих shRNA, в клетки Kasumi-1 уровень экспрессии *AML1-ETO* и *c-kit* снижается в 8 и в 3 раза соответственно по сравнению с клетками, не обработанными биназой.

- обнаружено селективное апоптозиндуцирующее действие катионной бактериальной рибонуклеазы в отношении клеток миелогенного лейкоза K562, клеток карциномы легких A549, клеток глиомы мышей С6. Показано отсутствие цитотоксической активности РНКазы в отношении немалигнизированных клеток человека линии HUVES и лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, а также злокачественной фибросаркомы HT1080. Дифференциальная чувствительность клеток к апоптогенному действию биназы и других РНКаз бактерий, таких как катионные мутанты РНКазы Sa, может быть объяснена различным профилем экспрессии на их поверхности рецепторов-онкогенов, в частности, из группы *ras*.

- установлен сайт инициации трансляции в последовательности гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius (aprBi)*, (AN AY754946);

- проанализирована открытая рамка считывания гена, что позволило выявить три потенциальных сайта инициации синтеза белка (TTG, GTG и ATG), для каждого из которых с помощью алгоритма SignalP определены вероятностные значения их функциональной активности;
- сконструированы модифицированные гены субтилизиноподобной протеиназы, несущие замены нуклеотидов в предполагаемых стартовых кодонах;
- исследована экспрессия полученных генетических конструкций в клетках беспротеазного штамма *Bacillus subtilis* AJ73;

3. Для микоплазм:

- показано, что продукция токсических, в том числе генотоксических метаболитов у микоплазм (*A. laidlawii*, *M. gallisepticum*, *M. hominis*) зависит от условий культивирования соответствующих бактерий. Образующиеся при оптимальных условиях вегетативные формы клеток микоплазм, а также культуральная жидкость *M. gallisepticum*, индуцируют SOS-ответ у тестерного штамма *E. coli* PQ37. Тепловой шок приводит к появлению у вегетативных форм *M. hominis* также токсических свойств, тогда как окислительный стресс подавляет проявление генотоксичности у клеток микоплазмы, но вызывает появление ДНК-повреждающего действия у их культуральной жидкости. Некультивируемые формы микоплазм и их культуральная жидкость генотоксических свойств не проявляют;
- установлено, что длительное нахождение *M. gallisepticum* при низких температурах и кратковременное *M. hominis* при повышенной температуре, способствует накоплению токсических и генотоксических метаболитов и сорбции их на поверхности микоплазм. Метаболиты *A. laidlawii* в условиях низкой температуры и метаболиты *M. hominis* в условиях окислительного стресса накапливаются в среде, не сорбируясь на самих клетках;
- в клетках *A. laidlawii* PG8, *M. gallisepticum* S6, *M. hominis* PG37 выявлены белки, являющиеся секретлируемыми факторами вирулентности, определяющие токсигенный потенциал этих бактерий в их разных физиологических состояниях;
- определено, что рибонуклеазы микоплазм по первичной структуре сходны с внеклеточной рибонуклеазой Bsn, расщепляющей молекулы РНК с образованием нуклеозид-5'-монофосфатов;
- выявлено, что наиболее активным продуцентом рибонуклеаз является штамм *Acholeplasma laidlawii* PG8. Он образует несколько сходных по первичной структуре рибонуклеаз;

- рибонуклеазная активность обнаруживается в культуральной жидкости *Acholeplasma laidlawii* PG8. Наибольшая РНКазная активность регистрируется в стационарной стадии роста культуры *A.laidlawii* PG8, связанной с активным переходом вегетативных форм клеток микоплазмы в некультивируемые формы бактерии.

Таким образом, выполнение в соответствии с календарным планом заявленных научно-исследовательских работ привело к получению приоритетных результатов как для исследованных бациллярных штаммов, так и для штаммов микоплазм. Для всех использованных бактерий проведены основные группы работ, обозначенные в рамках проекта, и в итоге сгруппированных как (а): определение условий продукции токсигенных факторов бактерий и некоторых блоков механизма их биосинтеза; (б) выявление путей регуляции биосинтеза бактериальных белков с потенциально токсическими свойствами – рибонуклеаз и протеиназ; (в) анализ влияния токсигенных бактериальных белков на экспрессию онкогенов *kit* и *AML/ETO* и влияния гидролаз вегетативных и некультивируемых форм микоплазм на экспрессию генов и белков эукариот; (г) оценка цитотоксического и генотоксического действия секретируемых токсигенных факторов бактерий по отношению к нормальным и малигнезированным клеткам эукариот; (д) характеристика фибринолитической, тромболитической, антикоагулянтной и коллагенолитической активности микробных протеиназ и противоопухолевой активности бациллярных рибонуклеаз.

Аспекты возможного применения полученных результатов в биотехнологии и медицине базируются на проведенных молекулярно-генетических исследованиях. С одной стороны, последние связаны с конкретными задачами усиления биосинтеза практически ценных микробных гидролаз, а именно, с разработкой способа модификации промоторов генов протеиназ с целью получения высокопродуктивных штаммов и установлением факта гипериндукции синтеза биназы в *spo0A* мутантах, которые могут быть использованы при конструировании штаммов-суперпродуцентов бациллярных рибонуклеаз. С другой стороны, эти исследования привели к выявлению биологических эффектов микробных гидролаз, обусловленных каталитической активностью данных ферментов по отношению к соответствующему субстрату в эукариотических клетках либо организмах, чей гидролиз является основой токсического действия протеиназ и рибонуклеаз, которое у протеиназ проявляется в виде фибринолитической, тромболитической, антикоагулянтной и коллагенолитической активности, а у рибонуклеаз в виде апоптогенного действия на опухолевые клетки, в частности, клетки миелоидного лейкоза. Кроме того, по отношению к микоплазменным инфекциям человека предложен

принципиально новый подход, основанный на нейтрализации токсигенного потенциала этих внутриклеточных паразитов индуцированным переходом их в физиологическое состояние, характеризующееся снижением продукции токсических метаболитов.

Список использованных источников

1. **Балабан, Н. П.** Щелочная внеклеточная протеиназа *Bacillus intermedius*. Выделение, очистка и некоторые свойства фермента [Текст] / Н. П. Балабан, М. Р. Шарипова, А. М. Усманова, Е. А. Ицкович, И. Б. Лещинская // Биохимия. - 1993. - Т. 58, №12. - С. 1923-1928.
2. **Балабан, Н. П.** Секретируемая сериновая протеиназа спорообразующих бактерий *Bacillus intermedius* 3-19 [Текст] / Н.П. Балабан, М. Р. Шарипова, Е. Л. Ицкович, И. Б. Лещинская, Г. Н. Руденская // Биохимия. - 1994. - Т. 59, №9. - С. 1393-1400.
3. **Балабан, Н. П.** Получение и характеристика субтилизиноподобных протеиназ, секретируемых в стационарную фазу роста *Bacillus amyloliquefaciens* H2 [Текст] / Н. П. Балабан, Л. А. Маликова, А. М. Марданова, Г. Н. Руденская, М. Р. Шарипова // Биохимия.- -2007. -Т.72, № 4. -С. 568 – 575.
4. **Борхсениус С.Н.,** Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. 2002. *Микоплазмы*. СПб.: Наука.
5. **Головлев Е.Л.** 2003. Реакция бактериальных клеток на холодовой шок на уровне динамики хромосомы, транскрипции и трансляции. *Микробиология*. **72**, 5–13.
6. **Ицкович, Е. Л.** Энзиматические свойства тиолзависимой сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* 3-19 [Текст] / Е. Л. Ицкович, Н. П. Балабан, А. М. Марданова, Е. В. Шакиров, М. Р. Шарипова, И. Б. Лещинская, А. Л. Ксенофонов, Г. Н. Руденская // Биохимия. - 1997. - Т. 62, №1. - С.49-53.
7. **Кириллова, Ю. М.** Условия роста культуры и биосинтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* [Текст] / Ю. М. Кириллова, Е. О. Михайлова, Н. П. Балабан, А. М. Марданова, А. Р. Каюмов, Г. Н. Руденская, С. В. Костров, М. Р. Шарипова // Микробиология. –2006. –Т.75, №2. –С. 136–141.
8. **Маликова, Л.А.** Условия биосинтеза внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* КММ 62 [Текст] / Л. А. Маликова, А. М. Марданова, О. В. Соколова, Н. П. Балабан, Н. Г. Руденская, М. Р. Шарипова // Микробиология. -2007. –Т.76, №3. –С. 1-8.
9. **Степанова И.Ю.** Влияние кислородного стресса на углеводный метаболизм бактерий рода *Beggiatoa* / И.Ю. Степанова, Н.В. Парфенова, М. Зузу и др. // Вестник ВГУ. Серия Химия, биология. – 2001. – №2. – С. 157-159.
10. **Ушакова Н.А.,** Котенкова Е.В., Козлова А.А., Нифатов А.В. 2006. Изучение механизмов пробиотического действия штамма *Bacillus subtilis* 8130. *Прикладная биохимия и микробиология*. **42**, 285–291.

11. **Хочачка П.** Биохимическая адаптация: Пер. с англ. / П. Хочачка, Дж. Сомеро. – М.: Мир, 1988. – 568 с.
12. **Чернов В.М.,** Говорун В.М., Демина И.А., Горшков О.В., Музыкантов А.А., Шаймарданова Г.Ф., Чернова О.А. 2008. Адаптация микоплазм к неблагоприятным условиям роста: морфология, ультраструктура и экспрессия генома клеток *Mycoplasma gallisepticum* S6. Докл. РАН. **421**, 701–704.
13. **Шарипова, М. Р.** Гидролитические ферменты и спорообразование у *Bacillus intermedius* [Текст] / М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова, М.А. Шилова, Ю.М. Кадырова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. - 2002. - Т.71, №4. - С. 494-499.
14. **Altschul, S.F.** Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs [Text] / S.F.Altschul, T.L.Madden, A.A.Schaumluffer, J.Zhang, Z.Zhang, W.Miller, D.J.Lipman // Nucl. Acids Res.- 1997.- N25.- P. 3389-3402.
15. **Aoyama, M.** Sequence of the gene encoding serine proteinase of *Bacillus pumilus* [Text] / C. Toma, M. Yasuda, M. Iwanaga // Microbial Immunology. - 2000.- V.4, №5. - P. 389-393.
16. **Azuaga, A.I.** HPr as a model protein in structure, interaction, folding and stability studies / A.I. [Azuaga](#), J.L. [Neira](#), N.A. [van Nuland](#) // [Protein Pept. Lett.](#) – 2005. – Vol. 12. – P. 123-137.
17. **Barrett, J. F.** Two-Component Signal Transduction as a Target for Microbial Anti-Infective Therapy [Text] / J. F. Barrett, J. A. Hoch // Antimicrob Agents and Chemotherapy. –1998. –V.42. -P. 1529-1536.
18. **Bendtsen, J. D.** Improved prediction of signal peptides: SignalP3.0. [Text] / J. D. Bendtsen, H.Nielsen, G.von Heijne, S.Brunak // Molecular Biology.- 2004.- V.340.- P. 783-795.
19. **Bernhardt J.,** Weibezahn J., Scharf C., Hecker M. 2003. *Bacillus subtilis* during feast and famine: visualization of the overall regulation of protein synthesis during glucose starvation by proteome analysis. *Genome Res.* **13**, 224–237.
20. **Bryan, P.** Catalysis of a protein folding reaction: mechanistic implications of the 2·0 A structure of the subtilisin-prodomain complex [Text] / P. Bryan, L. Wang, J. Hoskins, S. Ruvinov, S. Strausberg, P. Alexander, O. Almog, G. Gilliland, T. Gallagher // Biochemistry. - 1995. - V.34. – P. 10310–10318.
21. **Cecchini K.R.** Transcriptional responses of *Mycoplasma gallisepticum* strain R in association with eukaryotic cells / K.R. Cecchini, T.S. Gorton, S.J. Geary // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189. – P. 5803-5807.

22. **Chang, S.** High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA [Text] / S.Chang, S.N.Cohen // Mol. Gen. Genet.- 1979.- V.168.- P. 1111-1115.
23. **Doyle, S.M.** Collaboration between the ClpB AAA+ remodeling protein and the DnaK chaperone system / S.M. Doyle, J.R. Hoskins, S. Wickner // PNAS. – 2007. – Vol. 104. – P. 11138–11144.
24. **Ferrari, E.** Transcription of *Bacillus subtilis* subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants [Text] / E.Ferrari, D.J.Henner, M.Perego, J.A.Hoch // J. Bacteriol.- 1988.- V.170.- P.289-295.
25. **Garland S.M., Tsai Y-C., Kendrick M.I., Kass E.H.** 1987. Absence of significant cellulase activity in microbial flora of the female genital tract. *Infect. Immun.* **55**, 414–419.
26. **Goulhen, F.** Oral microbial heat-shock proteins and their potential contributions to infections / F. [Goulhen](#), D. [Grenier](#), D. [Mayrand](#) // [Crit. Rev. Oral Biol. Med.](#) – 2003a. – Vol. 14. – P. 399-412.
27. **Goulhen, F.** Stress response in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: induction of general and specific stress proteins / F. [Goulhen](#), D. [Grenier](#), D. [Mayrand](#) // [Res. Microbiol.](#) – 2003b. – Vol. 154. – P. 43-48.
28. **Han M.J., Lee S.Y.** 2006. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 362–469.
29. **Heim S., Del Mar Lleo M., Bonato B., Guzman C.A., Canepari P.** 2002. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J. Bacteriol.* **184**, 6739–6745.
30. **Hopfe M., Henrich B.** 2008. OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells. *BMC Microbiol.* **8**, 55--59.
31. **Hu J., Qian W., He C.** 2007. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *eglXoB* endoglucanase gene is required for virulence to rice. *FEMS Microbiol. Lett.* **269**, 273–279.
32. **Ilinskaya ON, Zelenikhin PV, Petrushanko IY, Mitkevich VA, Prassolov VS & Makarov AA** (2007) Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response. *Biochem Biophys Res Commun* **361**, 1000-1005.
33. **Ilinskaya ON, Koschinski A, Repp H, Mitkevich VA, Dreyer F, Scholtz JM, Pace CN & Makarov AA** (2008) RNase-induced apoptosis: Fate of calcium-activated potassium channels. *Biochimie* **90**, 717-725.
34. **Kühner S., van Noort V., Betts M.J., Leo-Macias A., Batisse C., Rode M., Yamada T., Maier T., Bader S., Beltran-Alvarez P., Castaño-Diez D., Chen W.-H., Devos D., Güell**

- M., Norambuena T., Racke I., Rybin V., Schmidt A., Yus E., Aebersold R., Herrmann R., Böttcher B., Frangakis A.S., Russell R.B., Serrano L., Bork P., Gavin A.-C. 2009. Proteome organization in a genome-reduced bacterium. *Science*. **326**, 1235–1240.
35. **Lee E.-Y.**, Choi D.-Y., Kim D.-K., Kim J.-W., Park J.O., Kim S., Kim S.-H., Desiderio D.M., Kim Y.-K., Kim K.-P., Gho Y.S. 2009. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*. **9**, 5425–5436.
36. **Lindsay, H.** FAD insertion is essential for attaining the assembly competence of the dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) monomer from *Escherichia coli* / H. Lindsay, E. Beaumont, S.D. Richards et al. // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 36665–36670.
37. **Loh, J.** The *Bradyrhizobium japonicum* nolA gene encodes three functionally distinct proteins [Text] / J.Loh, M.G.Stacey, M.J.Sadowsky, G.Stacey // J Bacteriol.- 1999.- V.181.- P.1544-1554.
38. **Makarov AA & Ilinskaya ON** (2003) Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett* **540**, 15-20.
39. **Makarov AA, Kolchinsky A & Ilinskaya ON** (2008) Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *BioEssays* **30**, 781-790.
40. **Mitkevich VA, Petrushanko IY, Kretova OV, Spirin PV, Zelenikhin PV, Prassolov VS, Tchurikov NA, Ilinskaya ON & Makarov AA** (2010) Oncogenic c-kit transcript is a target for binase. *Cell Cycle* **9**, 2674-2678.
41. **Mitkevich VA, Tchurikov NA, Zelenikhin PV, Petrushanko IY, Makarov AA & Ilinskaya ON** (2010) Binase cleaves cellular noncoding RNAs and affects coding mRNAs. *FEBS J* **277**, 186-196.
42. **Mitkevich VA, Schulga AA, Ermolyuk YS, Lobachov VA, Chekhov VO, Yakovlev GI, Hartley RW, Pace CN, Kirpichnikov MP & Makarov AA** (2003) Thermodynamics of denaturation of complexes of barnase and binase with barstar. *Biophys Chem* **105**, 383-390.
43. **Morel-Deville, F.** Characterization of the translational start site for IF2 beta, a short form of *Escherichia coli* initiation factor IF2 [Text] / F.Morel-Deville, G.Vachon, C.Sacerdot, A.J.Cozzone, M.Grunberg-Manago, Y.Cenatiempo // Eur J Biochem.- 1990.- V.188.- P. 605-614.
44. **Murray-Rust J.** Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase / J. Murray-Rust, J. Leiper, M. McAlister et al. // Nat. Struct. Biol. – 2001. – Vol. 8. – P. 679-683.

45. **Noh E.J.**, Kang S.W., Shin Y.J., Kim D.C., Park I.S., Kim M.Y., Chun B.G., Min B.H. 2002. Characterization of mycoplasma arginine deiminase expressed in *E. coli* and its inhibitory regulation of nitric oxide synthesis. *Mol. Cells.* **28**, 137–143.
46. **Michalik S.**, Liebeke M., Zühlke D., Lalk M., Bernhardt J., Gerth U., Hecker M. 2009. Proteolysis during long-term glucose starvation in *Staphylococcus aureus* COL. *Proteomics.* **9**, 4468–4477.
47. **Muela A.**, Seco C., Camafeita E. 2008. Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.* **64**, 28–36.
48. **Oliver J.D.** The viable but nonculturable state in bacteria // J. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 93-100.
49. **Papazisi L.** The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R_{low} / L. Papazisi, T.S. Gorton, G. Kutish et al. // Microbiol. – 2003. – Vol. 149. – P. 2307-2316.
50. **Park, S.K.** Site-directed mutagenesis of the dual translational initiation sites of the *clpB* gene of *Escherichia coli* and characterization of its gene products [Text] / S.K.Park, K.I.Kim, K.M.Woo, J.H.Seol, K.Tanaka, A.Ichihara, D.B.Ha, C.H.Chung // J. Biol. Chem.- 1993.- V.268.- P. 20170-20174.
51. **Pereyre S.**, Sirand-Pugnet P., Beven L., Charron A., Renaudin H., Barre A., Avanaud P., Jacob D., Couloux A., Barbe V., de Daruvar A., Blanchard A., Bebear C. 2009. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *Plos Genetics.* **5**, e1000677.
52. **Polyakov KM**, Lebedev AA, Okorokov AL, Panov KI, Schulga AA, Pavlovsky AG, Karpeisky MY & Dodson GG (2002) The structure of substrate-free microbial ribonuclease binase and of its complexes with 3'GMP and sulfate ions. *Acta Cryst Section D* **58**, 744-750.
53. **Renzone, G.** Differential proteomic analysis in the study of prokaryotes stress resistance / G. [Renzone](#), C. [D'Ambrosio](#), S. [Arena](#) et al. // [Ann. Ist. Super Sanita.](#) – 2005. – Vol. 41. – P. 459-468.
54. **Rocha, E.P.** Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis [Text] / E.P.Rocha, A.Danchin, A.Viari // Nucleic Acids Res.- 1999.- V.27.- P. 3567-3576.
55. **Sambrook, J.** Molecular cloning: a laboratory manual [Text] / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis // Cold Spring Harbor Laboratory Press. -1989.

56. **Schröder H.** DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage / H. Schröder, T. Langer, F.U. Hartl, B..Bukau // EMBO J. – 1993. – Vol. 12. – P. 4137-4144.
57. **Seol, J.H.** The 65-kDa protein derived from the internal translational initiation site of the clpA gene inhibits the ATP-dependent protease Ti in *Escherichia coli* [Text] / J.H.Seol, S.J.Yoo, K.I.Kim, M.S.Kang, D.B.Ha, C.H.Chung // J. Biol. Chem.- 1994.- V.269.- P. 29468-29473.
58. **Sharipova M.** The expression of the serine proteinase gene of *Bacillus intermedius* in *Bacillus subtilis* [Text] / Sharipova M, Balaban N, Kayumov A, Kirillova Y, Mardanova A, Gabdrakhmanova L, Leshchinskaya I, Rudenskaya G, [Akimkina T](#), [Safina D](#), [Demidyuk I](#), Kostrov S. // Microbiol Res. – 2008. –V.163. –P. 39-50.
59. **Shih, C.-J.** Analysis of the AAA+ chaperone clpB gene and stress-response expression in the halophilic methanogenic archaeon *Methanohalophilus portucalensis* / C.-J. Shih, M.-C. Lai // Microbiology. – 2007. – Vol. 153. – P. 2572–2583.
60. **Shinde, U.P.** Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones [Text] / U. P. Shinde, J. J. Liu, M. Inouye // Nature. -1997. –V.389. –P.520-522.
61. **Siezen, R. J.** Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteinases [Text] / R. J. Siezen, A. M. Leunissen // Protein science. – 1997. – V. 6. - P. 501-523.
62. **Sorokin, A.V.** Expression unit from the replication region of the *Streptococcal* plasmid pSM19035 [Text] / A.V.Sorokin, V.E.Khazak // Molecular Biology.- 1990.- V.24.- P. 993-1000.
63. **Schröder H.** DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage / H. Schröder, T. Langer, F.U. Hartl, B..Bukau // EMBO J. – 1993. – Vol. 12. – P. 4137-4144.
64. **Schulga A,** Kurbanov F, Kirpichnikov M, Protasevich I, Lobachev V, Ranjbar B, Chekhov V, Polyakov K, Engelborghs Y & Makarov A (1998) Comparative study of binase and barnase: experience in chimeric ribonucleases. *Protein Eng* **11**, 775–782.
65. **Takeuchi, Y.** Refined crystal structure of the complex of subtilisin BPN' and Streptomyces subtilisin inhibitor at 1.8 Å resolution [Text] / Y.Takeuchi, Y.Satow, K.T.Nakamura, Y.Mitsui // J. Mol. Biol.- 1991.- V. 221.- P. 309-325.
66. **Tam T.L.,** Antelmann H., Eymann C., Albrecht D., Bernhardt J., Hecker M. 2006. Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach. *Proteomics*. **6**, 4565–4585.

67. **Völker, U.** From genomics via proteomics to cellular physiology of the Gram-positive model organism *Bacillus subtilis* / U. Völker, M. Hecker // Cell. Microbiol. – 2005. – Vol. 7. – P. 1077–1085.
68. **Wang Y-Y, Zhou G-B, Tong YT, Chen B, Shi J-Y, Liang W-X, Xiao-Long Jin X-L, You J-H, Yang G, Shen Z-X, Chen J, Xiong S-M, Chen G-Q, Feng X, Liu Y-W, Chen Z & Chen S-J (2005)** AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: Implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 1104-1109.
69. **Wasinger, V.C.** The proteome of *Mycoplasma genitalium*. Chaps-soluble component / V.C. Wasinger, J.D. Pollack, I. Humphery-Smith // Eur. J. Biochem. – 2000. – Vol. 267. – P. 1571-1582.
70. **Wen Z.T., Suntharaligham P., Cvitkovitch D.G., Burne R.A.** 2005. Trigger factor in *Streptococcus mutans* is involved in stress tolerance, competence development, and biofilm formation. *Infect. Immun.* **73**, 219–225.
71. **Yabuta, Y.** Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: propeptide release modulates activation precision of pro-subtilisin [Text] / Y. Yabuta, H. Takagi, M. Inouye, U. Shinde // J. Biol. Chem. - 2001. - V. 276. P. 44427–44434.
72. **Yakovlev GI, Chepurnova NK, Moiseyev GP, Bocharov AL & Lopatnev SV (1987)** Specificity of the bacillus intermedius 7P RNase in reaction of polynucleotide cleavage. *Bioorg Khim* **13**, 338-343.
73. **Yakovlev GI, Moiseyev GP, Struminskaya NK, Borzykh OA, Kipenskaya LV, Znamenskaya LV, Leschinskaya LB, Chemokalskaya EB & Hartley RW (1994)** Mutational analysis of the active site of RNase of Bacillus intermedius (BINASE). *FEBS Lett* **354**, 305-306.