

УДК 579.8.05

АДАПТАЦИЯ МИКОПЛАЗМ К СТРЕССОВЫМ УСЛОВИЯМ: ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТЕОМА У *Mycoplasma hominis* PG37 ПРИ ГОЛОДАНИИ И ПОНИЖЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ СРЕДЫ

© 2011 г. В. М. Чернов*, О. А. Чернова, Н. Б. Баранова, О. В. Горшков,
Е. С. Медведева, Г. Ф. Шаймарданова

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра
Российской академии наук, Казань, 420111

Поступила в редакцию 04.02.2011 г.

Принята к печати 10.03.2011 г.

Mycoplasma hominis — одна из наиболее распространенных микоплазм (класс Mollicutes), ассоциированных с социально-значимыми заболеваниями человека и контаминацией клеточных культур. Решение проблемы контроля инфекций, вызываемых *M. hominis*, связывают с пониманием молекулярных механизмов, определяющих выживание бактерии в неблагоприятных условиях среды. При помощи протеомного подхода (2-DIGE и MALDI TOF/TOF MS) впервые выявлены 53 белка *M. hominis* PG37, количественное содержание которых различается у микоплазм, культивируемых в оптимальных и стрессовых (голодание и пониженная температура среды) условиях. Согласно классификации по 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; 24 белка (45.28%) относятся к факторам вирулентности. Белки *M. hominis* PG37, уровень которых изменяется в неблагоприятных условиях, связаны с адаптацией микоплазмы к стрессорам и служат потенциальными мишенями контроля инфекций, вызываемых этой бактерией.

Ключевые слова: *Mycoplasma hominis* PG37, адаптация к стрессовым условиям, 2D-электрофорез, масс-спектрометрия, белковый профиль.

THE ADAPTATION OF MYCOPLASMAS TO STRESS CONDITIONS: FEATURES OF PROTEOME SHIFT IN *Mycoplasma hominis* PG37 UNDER STARVATION AND LOW TEMPERATURE, by V. M. Chernov*, O. A. Chernova, N. B. Baranova, O. V. Gorshkov, E. S. Medvedeva, G. F. Shaymardanova (Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia; *e-mail: chernov@mail.knc.ru). *Mycoplasma hominis* — one of the widely spread mycoplasmas (class Mollicutes), associated with the socially significant human diseases and contamination of cell cultures. The solution of the problem on controlling *M. hominis* infections is connected with determination of the molecular basis, responsible for mechanisms of bacterium survival under unfavorable conditions. As a result of proteomic approach (2-DIGE and MALDI TOF/TOF MS) for the first time, 53 *M. hominis* PG37 proteins were detected, different abundance of which occurred at cultivating the bacterium under stress (starvation and low temperature) conditions. According to the classification of proteins by functional category (clusters of orthologous groups of proteins – COG), 47 of the 53 proteins of the mycoplasma are involved in the fundamental cellular and biochemical processes — translation (12; 22.64%), transcription (2; 3.77%), posttranslational modification (7; 13.20%), cell cycle control (2; 3.77%), energy production and conversion (6; 11.32%), carbohydrate transport and metabolism (3; 5.66%), amino acid transport and metabolism (8; 15.09%), nucleotide transport and metabolism (6; 11.32%), inorganic ion transport and metabolism (1; 1.89%). The functions of six proteins (11.32%) have not been found; 24 proteins (45.28%) are the factors of bacterium virulence. *M. hominis* PG37 proteins, the expression modulation of which arises under the unfavorable environmental conditions, are the components of adaptation mechanisms of the mycoplasma to the stressors and potential targets for controlling infections caused by this bacterium.

Keywords: *Mycoplasma hominis* PG37, adaptation to stress conditions, two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, protein profile.

Принятые сокращения: УМФ — ультрамикрорформы; МВ — мембранные везикулы; COG — clusters of orthologous groups of proteins (кластеры ортологичных групп белков); CHAPS — 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (3-[(3-холами-допропил) (диметиламмоний)-1-пропансульфонат]).

* Эл. почта: chernov@mail.knc.ru

Mycoplasma hominis — одна из наиболее распространенных микоплазм (класс Mollicutes), ассоциированных с социально-значимыми заболеваниями человека и контаминацией клеточных культур [1, 2]. В организм человека *M. hominis* может проникать как вертикальным — от матери к плоду, так и горизонтальным — контактным — путями [1–4], и вызывать развитие острых и хронических урогенитальных инфекций аппаратного и инаппаратного типов, обуславливающих осложнения беременности, патологии и гибель плода [2–4]. Источником заражения клеточных культур *M. hominis* служит персонал лаборатории, реактивы и оборудование, лабораторная посуда и т.д. [1], что предполагает возможность выживания микоплазмы вне организма человека с сохранением вирулентных свойств — инфекционности, токсигенности и персистенции. Сравнительно недавно появились сведения о способности *M. hominis* существовать в условиях, значительно отличающихся от основной среды обитания бактерии, — при пониженной температуре, а также при ограничении питательных веществ и источника энергии (голодание) [5–7]. Эти данные свидетельствуют о значительном адаптивном потенциале микоплазмы и широком спектре возможных путей заражения ею человека.

Подавление инфекций, вызываемых *M. hominis*, представляет серьезную проблему, решение которой предполагает выяснение молекулярных основ персистенции микоплазмы, связанных с факторами, определяющими как восприимчивость к *M. hominis*, так и выживание бактерии в неблагоприятных условиях среды [1, 4, 8]. Определение в 2009 году полной нуклеотидной последовательности генома *M. hominis* PG21 [9] обеспечило возможность использования постгеномных технологий для выявления белков и генов, вовлеченных в адаптацию бактерии к стрессорам. Однако сообщения о проведении соответствующих исследований отсутствуют. Задача данной работы — сравнительный анализ протеома клеток *M. hominis* PG37 в оптимальных и стрессовых (понижение температуры среды и голодание) условиях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток микоплазмы. В работе использован штамм *M. hominis* PG37, полученный из коллекции микроорганизмов Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (РАМН, Москва). Клетки *M. hominis* PG37 выращивали в оптимальных условиях — при 37°C в жидкой питательной среде Эдварда (1.5% триптозы, 0.2% NEPES, 5% дрожжевого экстракта, 10% сыворотки крови лошади, 1% аргинина, 0.2% пенициллина (1000 ед/мл), 0.003% фенолового красного) согласно [1]. Для получения культуры *M. hominis* PG37, адаптированной к неблагоприятным условиям, — голоданию и пониженной температуре (30°C), ис-

пользовали описанный ранее метод [10, 11], модифицированный в соответствии с особенностями роста этой микоплазмы [1]. Для этого из питательной среды Эдварда исключали сыворотку, дрожжевой экстракт и аргинин (основной источник энергии микоплазмы). Выращенную на полноценной питательной среде Эдварда культуру *M. hominis* PG37 (середина логарифмической фазы роста) подвергали холодному шоку (8°C в течение 2 ч) для быстрой остановки экспоненциального роста и, соответственно, предотвращения стрессовых условий, характерных для поздней логарифмической фазы роста [12]. Клетки собирали центрифугированием (5500 g, 8°C, 30 мин), осадок суспендировали в ограниченной по составу среде (1.5% триптозы, 0.2% NEPES, 0.2% пенициллина (1000 ед/мл)), объем которой в 4 раза превышал объем полноценной среды, на которой были выращены клетки микоплазмы, и инкубировали в течение 28 нед при пониженной температуре среды (30°C). Клетки *M. hominis* PG37, инкубированные в неблагоприятных условиях, составили опытную группу, а в оптимальных — контрольную.

Выделение, дифференциальная окраска и разделение белков с помощью двумерного электрофореза. Культуру клеток *M. hominis* PG37 центрифугировали в течение 20 мин при 18514 g; осадок промывали, центрифугируя 2 раза в буфере, содержащем 150 mM NaCl, 50 mM Трис, 2 mM 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 *M. hominis* PG37 обрабатывали смесью нуклеаз (“Amersham”). Белки растворяли в буфере, содержащем 8 M мочевины, 2 M тиомочевину, 2% амфолинов (pH 3–10), 80 mM 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 Брэдфорд с помощью Quick Start Bradford Dye Reagent (“Bio-Rad”). Белки метили цианидами CyDye3-DIGE (зеленая флуоресценция) и CyDye5-DIGE (красная флуоресценция) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (“Amersham”). После остановки реакции с помощью 10 mM раствора лизина добавляли ДТТ до концентрации 100 mM 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 M мочевины, 4%-ный акриламид/метиленбисакриламид, 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 M мочевины, 30% глицерина, 62.5 mM Трис-HCl (pH 6.8) (“Amersham”), 2%-ный додецилсульфат натрия (“Bio-Rad”), бромфеноловый синий (“Sigma”) и 20 mM 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 mA на стекло – 20 мин, по 40 mA на стекло – 2 ч, по 35 mA на стекло – 2.5 ч.

Электрофореграммы сканировали на сканере Turphoon 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 [13], белковые пятна вырезали и идентифицировали.

Идентификация белков *M. hominis* PG37 с помощью MALDI TOF/TOF MS. Белки, после их экстракции из геля и трипсинолиза [14], 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 рефлектомоде после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.007% с учетом возможного окисления метионина кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом. Идентификацию белков по “пептидному фингерпринту” 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 *M. hominis* PG21. При параметре достоверности “score” > 67 идентификация белка считалась надежной ($p < 0.05$).

Трансмиссивная электронная микроскопия. Трансмиссивную электронную микроскопию клеток микоплазмы проводили согласно [15]. 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 M, 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 сахаразы в течение 1.5 ч. Осадок промывали фосфатно-солевым буфером (0.1 M, 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 [16]. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами установлено, что *M. hominis* PG37 способна успешно переживать длительное воздействие стрессовых условий, обусловленных пониженной температурой среды (30°C) и голоданием [5, 6]. Адаптация микоплазмы к стрессовым условиям сопровождается ее переходом в некультивируемое состояние, но на протяжении всего срока опыта (28 нед) в культуре преобладают основные модельные классы клеток *M. hominis* PG37 и помимо типичных клеток присутствуют ультрамикрорформы (УМФ) – сферические, окруженные мембраной наноструктуры, диаметром менее 0.2 мкм (рис. 1). Однако количество УМФ у *M. hominis* PG37 в стрессовых условиях достоверно увеличивается (рис. 2). По размерам, морфологии и ультраструктуре большинство УМФ соответствует мембранным везикулам (МВ), участвующим у бактерий в секреции белков,

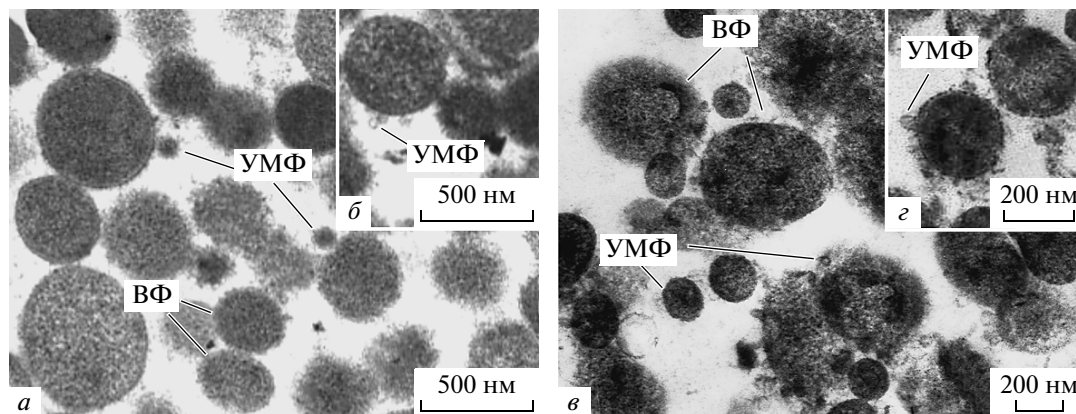


Рис. 1. Трансмиссивные микрофотографии клеток *M. hominis* PG37, культивируемых в оптимальных (а, б) и стрессовых (в, з) условиях. УМФ и ВФ –ультрамикроформы и вегетативные формы клеток микоплазмы соответственно.

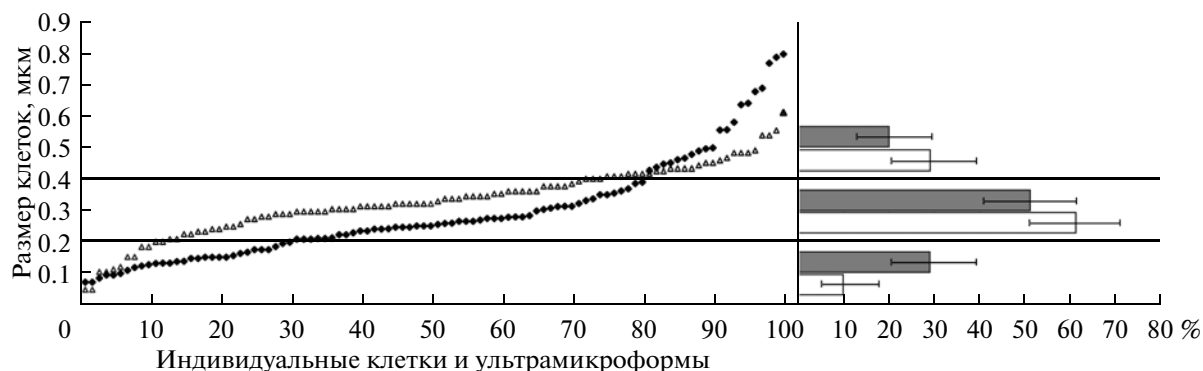


Рис. 2. Соотношение индивидуальных клеток и ультрамикроформ *M. hominis* PG37 в контроле (Δ) и опыте (◆) по данным трансмиссивной электронной микроскопии. График построен на основе линейных размеров индивидуальных клеток и ультрамикроформ в культуре микоплазмы, сортированных от минимальных к максимальным. 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.

межклеточных взаимодействиях и патогенезе [17]. Изменение транспорта белков в стрессовых условиях, связанное с интенсификацией образования МВ, сопровождается существенной реорганизацией протеома микроорганизмов [17, 18]. Однако сообщения о подобных исследованиях у микоплазм не опубликованы.

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. 3, таблица). Согласно функциональным категориям (clusters of orthologous groups of proteins – COG), 47 из 53 белков микоплазмы участвуют в ключевых про-

цессах – 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 изменен спектр изоформ и их уровень. Образование изоформ можно рассматривать как универсальную защитную реакцию бактерий, способствующую оптимизации клеточных процессов в стрессовых условиях [19].

Изменения в уровне белков внутри функциональных групп носили разнонаправленный характер. Наблюдалось существенное изменение содержания белков, участвующих в метаболизме аргини-

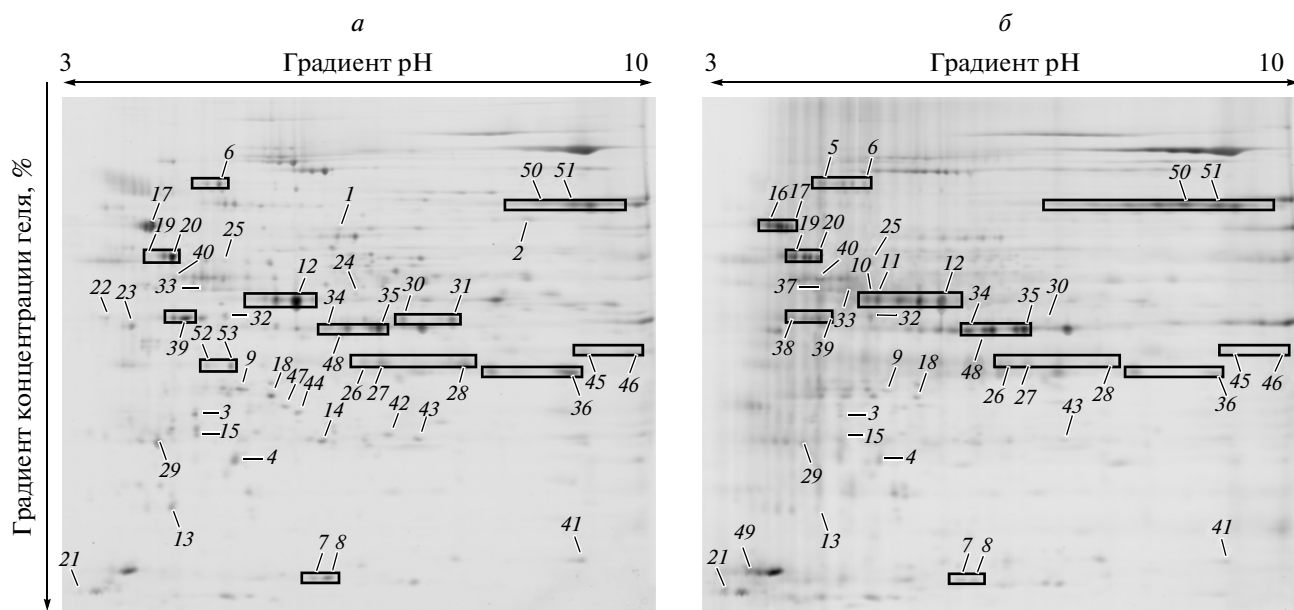


Рис. 3. 2D-электрофореграмма фракции растворимых белков *M. hominis* PG37, культивируемых в оптимальных (а) и стрессовых (б) условиях. Стрелками и цифрами обозначены идентифицированные белки микоплазмы. В рамки заключены изоформы белков.

на, сниженное 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-карбамоил-трансферазы (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 [9]. Показано, что при контаминации клеточных культур *M. hominis* активно извлекает аргинин из белков инфицированных клеток [1]. 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 метаболизме аргинина, являются факторами вирулентности [20], 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 [21]. 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 понимания механизмов адаптации представляет целлюлаза (Cel), количество которой у *M. hominis* возрастает в стрессовых условиях. Этот фермент распространен у фитопатогенных бактерий [22]. Вместе с тем, он имеется и у некоторых бактерий, населяющих кишечный и урогенитальный тракты человека [23]. Показано, что повышение уровня целлюлазы в среде обуславливает увеличение количества лактобацилл [24] — основного фактора эубиоза кишечного и генитального трактов. Модуляция количества целлюлазы у *M. hominis* PG37 в разных условиях среды, вероятно, связана с общими сигнальными системами в микробиоценозах, обеспечивающими адаптацию бактерий и микроекосистем 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, ACK, GAPDH у *Bacillus subtilis*; TufB, Tsf, EF-G, RbfA, DnaK, ClpB, GrpE, Trigger factor, FtsZ, ACK, 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 [11, 25–29]). Однако в целом количественные и качественные изменения в пулах растворимых белков у раз-

Белки *M. hominis* PG37, количество которых изменяется при культивировании микоплазмы в стрессовых условиях

Функциональная категория ¹	Белок ²	NCBI Acc. no	Score ³	Перекрытие, %	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-цис-транс-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	К
	Цитоадгезин (Vaa)	gi 2764639	262	57	39784/5.16	К
Энергообразование	Ацетаткиназа (АСК)	gi 269115159	254	54	45101/6.39	К
	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
Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH)		gi 6523351	167	63	29019/5.35	К
Целлюлаза (Cel)		gi 269115173	286	72	39981/5.5	1.91

Таблица. Окончание

Функциональная категория ¹	Белок ²	NCBI Acc. no	Score ³	Перекрытие, %	Mascot Mr, (Da)/pI ⁴	Изменение количества ⁵
Транспорт и метаболизм аминокислот	Аргининдезимидаза (ADI)	gi 728876	85	18	46284/5.52	5.88
	Орнитин-карбамоилтрансфераза, (ArcB)	gi 269114838	158	42	38295/6.2	5.19
	Орнитин-карбамоилтрансфераза, (ArcB)	gi 269114838	199	57	38295/6.2	1.61
	Карбаматкиназа (СК)	gi 269114837	154	51	32951/6.99	5.81
	Аминопептидаза С (PepC)	gi 269114809	109	30	51544/5.41	О
	ХАА-Про-дипептидаза (PepQ)	gi 269114986	141	36	39209/5.27	О
	ХАА-Про-дипептидаза (PepQ)	gi 269114986	177	54	39209/5.27	11.29
Транспорт и метаболизм нуклеотидов	Хаа-His-дипептидаза (Хаа-His)	gi 269115284	95	21	49431/5.47	7.35
	Цитидиндезаминаза (Cdd)	gi 269115032	70	48	14632/6.81	3.37
	Дезоксирибозофосфат-альдолаза (DeoC)	gi 269115108	212	62	24252/6.75	К
	Гуанилаткиназа (ГМК)	gi 269115261	162	58	23903/6.47	4.01
	Уридилаткиназа (УМРК)	gi 269115235	193	56	27046/5.87	К
	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 ионов	АТФ-связывающий белок импорта кобальта (CbiO1)	gi 269114971	201	43	29765/5.83	К
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	О
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	К
	Гипотетический белок (hp)	gi 20152569	201	54	34998/5.55	К

Примечание: ¹Распределение белков по функциональным категориям (COG). ²Подчеркнуты белки 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 pI) согласно базе данных. ⁵Кратность изменения количества белка (жирный шрифт – увеличение количества, обычный – уменьшение). К – обнаружен в контроле, но отсутствует в опыте; О – обнаружен в опыте, но отсутствует в контроле.

ных бактерий при голодании существенно различаются, что отражает существование универсальных и специфичных элементов фундаментальных механизмов адаптации различных микроорганизмов к стрессовым условиям.

На рис. 4 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 [30], 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 [25–27].

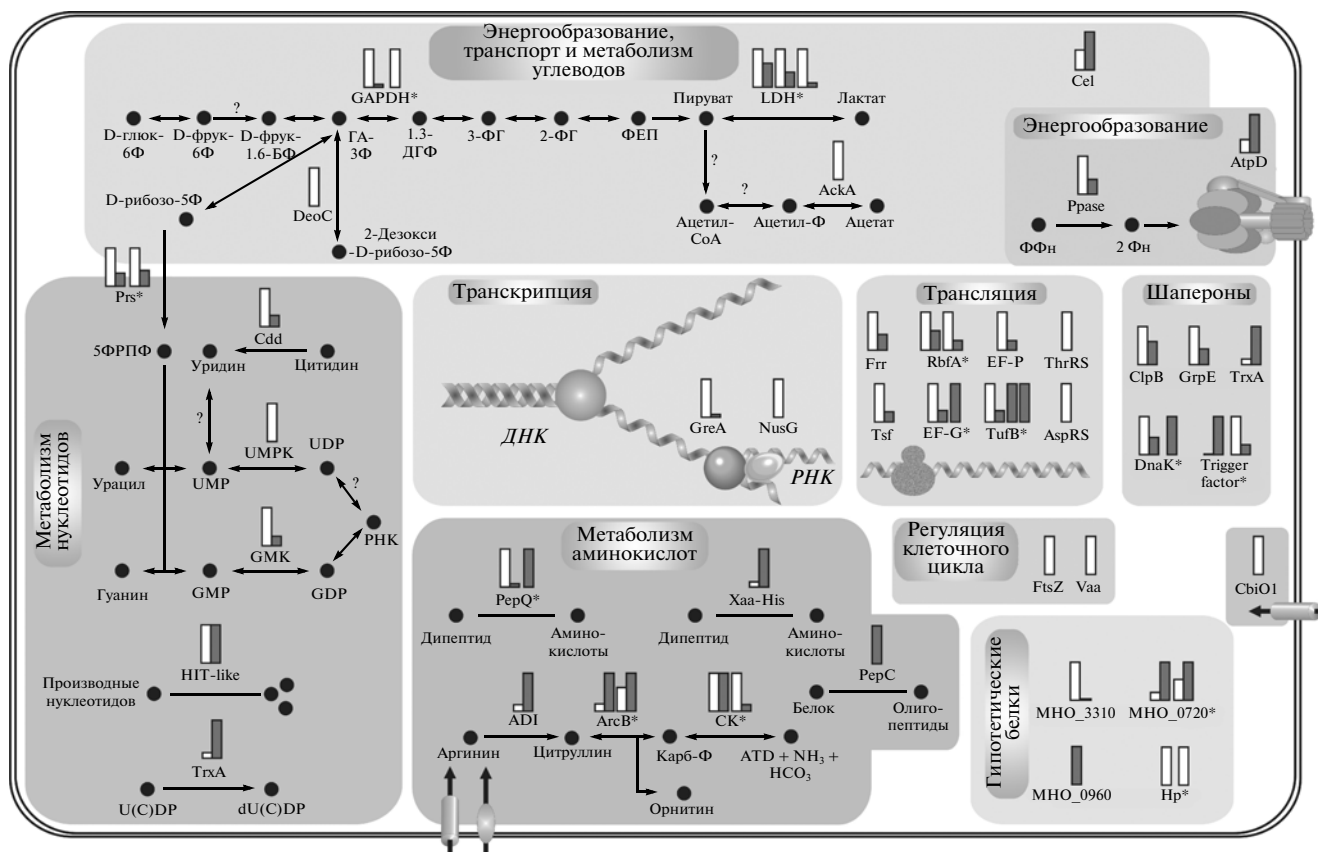


Рис. 4. Возможное участие в клеточных процессах белков *M. hominis* PG37, количество которых изменяется в стрессовых условиях. D-глюк-6Ф – D-глюкозо-6-фосфат; D-фрук-6Ф – D-фруктозо-6-фосфат; D-фрук-1,6БФ – D-фруктозо-1,6-бисфосфат; ГА-3Ф – глицеральдегид-3-фосфат; 1,3-ДФГ – глицерат-1,3-дифосфат; 3-ФГ – 3-фосфолицират; 2-ФГ – 2-фосфолицират; ФЕП – фосфоенолипируват; 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; Pp – пирофосфат неорганический; Pn – фосфат неорганический; Карбамоил-Ф – карбамоилфосфат; РНК – рибонуклеиновая кислота. □ – контроль; ■ – опыт; * – изоформы белков; ? – отсутствие ферментов (и их генов), определяющих реакции.

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 [17, 27, 31, 32]. Так, значительное увеличение количества пептидилпролил-*цис-транс*-изомеразы FKBP-типа (trigger factor) – цитозольного шаперона эубактерий, вовлеченного в секрецию и постсекреторный фолдинг протеаз [12, 33], вероятно, связано с интенсификацией транспорта белков у микоплазмы в стрессовых условиях.

Показано, что в условиях стресса у патогенных бактерий происходит интенсивное образование МВ, участвующих в транспорте белков [34]. Значительную долю белков в составе МВ патогенных бактерий составляют факторы вирулентности, определяющие возможность проникновения микроорга-

низмов в клетку хозяина для переживания неблагоприятных условий.

Из 53 белков *M. hominis* PG37, количество которых изменяется в стрессовых условиях, 24 белка (45.28%) относятся к факторам вирулентности, некоторые из них обнаруживаются в составе МВ у филогенетически близких микоплазмам грамположительных бактерий (таблица). 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 МВ в пулах растворимых или ассоциированных с мембраной белков. Для проверки этого предположения потребуются субпротеомное профилирование *M. hominis* в оптимальных и стрессовых условиях, определение белков МВ и особенностей их сортировки в различных условиях среды.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории протеомного анализа ФГУ НИИ Физико-химической медицины М.В. Серебряковой и М.А. Галяминой за помощь в проведении протеомных исследований.

Исследования выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-01406а) и Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (ГКН№ 02.740.11.0391).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. 2002. *Микоплазмы*. СПб.: Наука.
2. Waites K.B., Katz V., Schelonka R.L. 2005. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin. Biol. Rev.* **18**, 757–789.
3. Прозоровский С.В., Раковская И.В., Вульфвич Ю.В. 1995. *Медицинская микоплазмология*. М.: Медицина.
4. Razin Sh., Herrmann R. 2002. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. N.Y.: Kluwer Acad./Plenum Publ.
5. Chernov V.M., Chernova O.A., Margulis A.B., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Medvedeva E.S., Kolpakov A.I., Ilinskaya O.N. 2009. Genotoxic effects of mycoplasma cells (*A. laidlawii* PG8, *M. gallisepticum* S6, *M. hominis* PG37) formed in different growth conditions. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* **6**, 104–107.
6. Trushin M.V., Chernov V.M., Gorshkov O.V., Baranova N.B., Chernova O.A. 2010. Atomic force microscopy analysis of DNA extracted from the vegetative cells and the viable, but nonculturable, cells of two mycoplasmas (*Acholeplasma laidlawii* PG8 and *Mycoplasma hominis* PG37). *The Scientific World JOURNAL*. **10**, 894–900.
7. Potasman I., Oren A., Srugo I. 1999. Isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* from public toilet bowls. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **20**, 66–68.
8. Чернова О.А., Баранова Н.Б., Акберова Н.И., Горшков О.В., Музыкантов А.А., Чернов В.М. 2008. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов IL-1B, IL-1RN и IL-10 у человека при персистенции микоплазм (*Mycoplasma hominis*). *Цитокины и воспаление*. **7**, 11–14.
9. 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.
10. Чернов В.М., Мухаметшина Н.Е., Гоголев Ю.В., Абдрахимов Ф.А., Чернова О.А. 2005. Адаптивные реакции микоплазм *in vitro*: “жизнеспособные, но некультивируемые формы” и наноклетки *Acholeplasma laidlawii*. *Микробиология*. **74**, 498–504.
11. 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.
12. Головлев Е.Л. 2003. Реакция бактериальных клеток на холодовый шок на уровне динамики хромосомы, транскрипции и трансляции. *Микробиология*. **72**, 5–13.
13. Blum H., Beier H., Gross H.J. 1987. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. **8**, 93–99.
14. Демина И.А., Серебрякова М.В., Ладыгина В.Г., Рогова М.А., Згода В.Г., Корженевский Д.А., Говорун В.М. 2009. Протеом бактерии *Mycoplasma gallisepticum*. *Биохимия*. **74**, 205–215.
15. Cole R.M. 1983. Transmission electron microscopy. Basic techniques. In: *Methods in Mycoplasmaology*. v. 1. Eds Razin Sh., Tully J.G. N.Y.: Acad. Press, 43–50.
16. Животовский Л.А. 1991. *Популяционная биометрия*. М.: Наука.
17. 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.
18. Frias A., Manresa A., de Oliveira E., López-Iglesias C., Mercade E. 2010. Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted antarctic bacteria. *Microb. Ecol.* **59**, 476–486.
19. Sriramulu D.D. 2009. Small heat shock proteins produced by *Pseudomonas aeruginosa* clonal variants isolated from diverse niches. *Proteomics Insights*. **2**, 39–47.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Michalik S., Liebecke 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.
28. 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.
29. Han M.J., Lee S.Y. 2006. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 362–469.
30. 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.
31. 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.
32. Шпанченко О.В., Бугаева Е.Ю., Головин А.В., Донцова О.А. 2010. Транс-трансляция: факты и гипотезы. *Молекуляр. биология*. **44**, 563–572.
33. 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.
34. Ellis T.N., Kuehn M.J. 2010. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 81–94.