Казанский государственный университет
им. В.И. Ульянова-Ленина

О.А.Чернова, В.М.Чернов, М.В.Трушин

МИКОПЛАЗМОЛОГИЯ

Учебное пособие

Казань
2008

Казанский государственный университет

О.А.Чернова, В.М.Чернов, М.В.Трушин

МИКОПЛАЗМОЛОГИЯ

Учебное пособие

Издательство
Казанского государственного университета
2008

Микоплазмы (класс Mollicutes) – самые малые из бактерий, способных к самостоятельному воспроизведению. Большой интерес к этим микроорганизмам обусловливается, с одной стороны, уникальностью структурной организации минимальной клетки, а с другой – диктуется практической необходимостью. Многие микоплазмы – возбудители заболеваний человека, животных, растений, основные контаминанты клеточных культур, в том числе используемых в биотехнологии для производства вирусных вакцин. Контроль микоплазменных инфекций представляет серьезную проблему, решение которой связывают с "постижением логики жизни минимальной клетки в терминах молекулярной биологии". В 1984 году профессором Г.Моровитцем (NASA, США) был предложен проект, основная идея которого заключалась в определении всех белков, нуклеиновых кислот и клеточных реакций микоплазм, знание которых позволило бы проверить догму молекулярной биологии о конечности "логики жизни", ее относительной простоте и доступности для исчерпывающего описания.

Проф. Гарольд Дж.Моровитц

Успешная реализация в последние годы геномно-протеомных проектов в отношении ряда микоплазм в значительной мере способствовала пониманию молекулярной и клеточной биологии этих микроорганизмов, их эволюции и взаимоотношений с клетками высших эукариот. Однако многие вопросы еще предстоит выяснить. В данном учебном пособии отражены основные проблемы и перспективы микоплазмологии с точки зрения молекулярно-генетических аспектов.

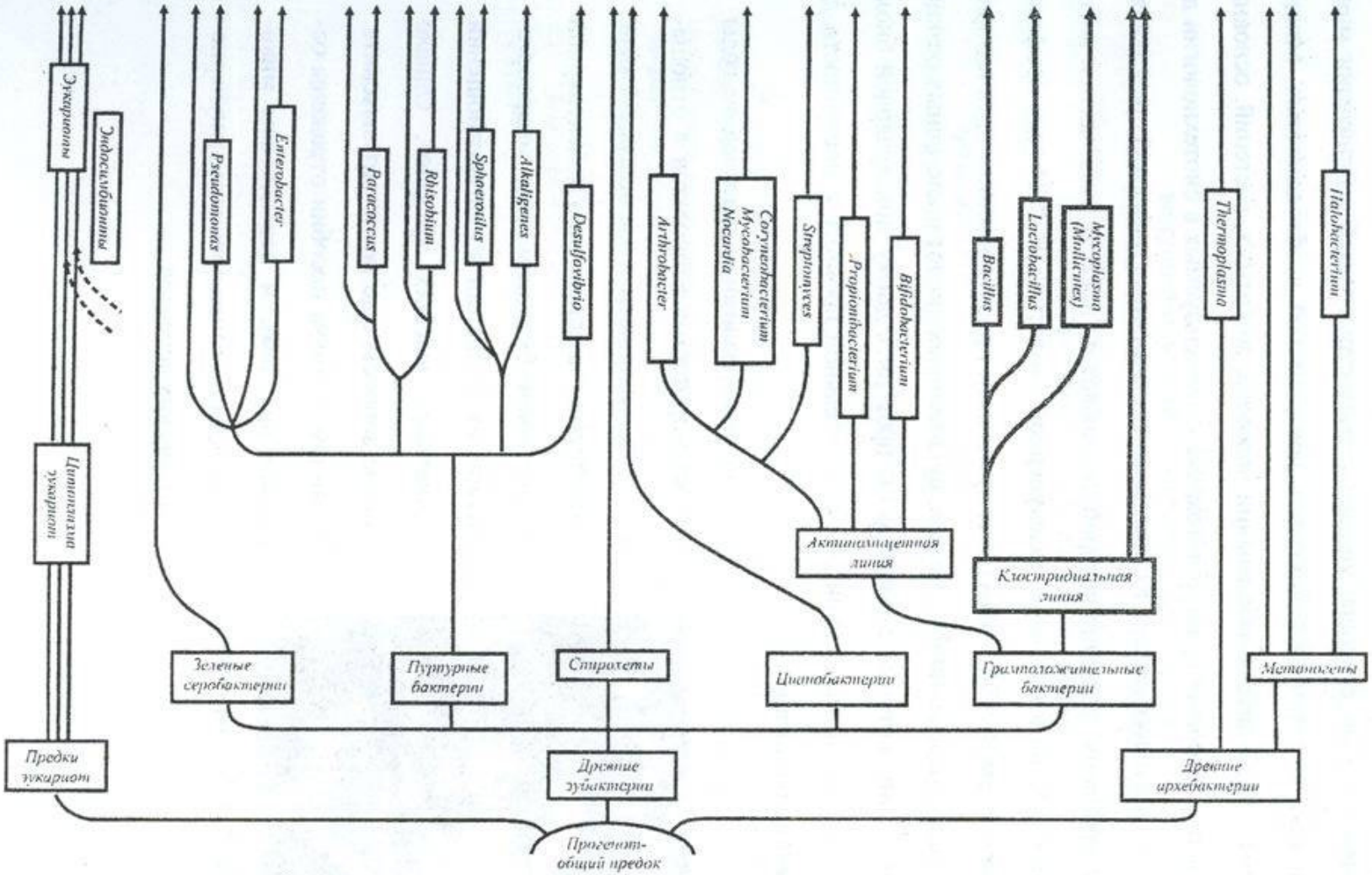


Рис. 1. **Схема основных направлений эволюции живых организмов, по данным анализа нуклеотидных последовательностей рРНК (по: Fox et al., 1980, с изменениями)**

Современные представления о происхождении микоплазм и их возможных филогенетических связях с другими прокариотами основаны на данных по полным структурам консервативных молекул ДНК и РНК (рис. 1). Эта принятая за основу филогенетическая схема построена на двух принципах: 1) родство между организмами устанавливается на основе наименьших расхождений в первичной структуре рРНК; 2) учитывается возможность эволюции генома не только путем дупликаций, но и путем упрощения, минимизации размеров за счет избавления от неинформативных или ставших ненужными участков ДНК. Основаниями для выбора генов рРНК для молекулярной систематики послужили присутствие и высокий консерватизм структуры молекул рРНК во всех видах микроорганизмов, митохондриях и хлоропластах, а также легкость определения соответствующих нуклеотидных последовательностей даже у некультивируемых бактерий. Поскольку горизонтальный перенос генов рРНК считается маловероятным, предполагают, что эволюция рРНК соответствует истории видообразования.

Результаты сравнительного анализа последовательностей молекул рРНК и тРНК свидетельствуют об относительной близости первичных структур 16S РНК микоплазм и бактерий родов *Clostridia, Bacillus, Lactobacillus*, а также *Streptococcus*. Однако значительная часть консервативных мотивов, общих для всех бактериальных 16S РНК, как оказалось, отсутствует в 16S РНК микоплазм, а каждый из видов микоплазм имеет существенную долю уникальных мотивов, не встречающихся в 16S РНК бактерий и других микоплазм. Это позволило исследователям определить микоплазмы как "тахителичные", т.е. быстро эволюционирующие бактерии вследствие повышенного темпа изменений в их геноме.

На основании совокупных молекулярно-генетических данных, полученных в начале 90-х годов, была предложена схема возможной эволюции и видообразования микоплазм, согласно которой предки микоплазм отделились от ветви *Streptococcus* примерно 600 млн. лет назад. Предполагается, что размер генома предковых форм составлял $2x10^6$ п.н.о. Приблизительно 450 млн. лет назад произошло разветвление предкового древа микоплазм. Из одной ветви образо-

вались представители *Asteroplasma, Anaeroplasma* и *Acholeplasma* (AAA), а из другой – *Spiroplasma, Entomoplasma* и *Mycoplasma* (SEM). При этом линия *Entomoplasma* включала *Mesoplasma.*

Редукция генома происходила в течение дегенеративной эволюции, вероятно, в обеих ветвях независимо. После появления цветковых растений регрессивная эволюция представителей ветви AAA, вероятно, определила появление фитоплазм (с размером генома 600-1200 т.п.о.), а представителей ветви SEM – *Spiroplasma* (с размером генома приблизительно 1200-2000 тыс.п.о.), *Entomoplasma, Mesoplasma, Mycoplasma* и *Ureaplasma* (с размером генома 600-1200 т.п.о.). Результаты использования нуклеотидных последовательностей бактериальных рРНК в качестве филогенетических часов для определения временной характеристики эволюции микоплазм позволили предположить, что ветвь AAA возникла в палеозое, а ветвь SEM - сразу после окончания пермского периода. Основным выводом из имеющихся данных является то, что микоплазмы – поздние продукты эволюции, формирование которых происходило при становлении современной флоры и фауны, т.е. на протяжении всей своей эволюционной истории микоплазмы были тесно связаны с клетками высших эукариот.

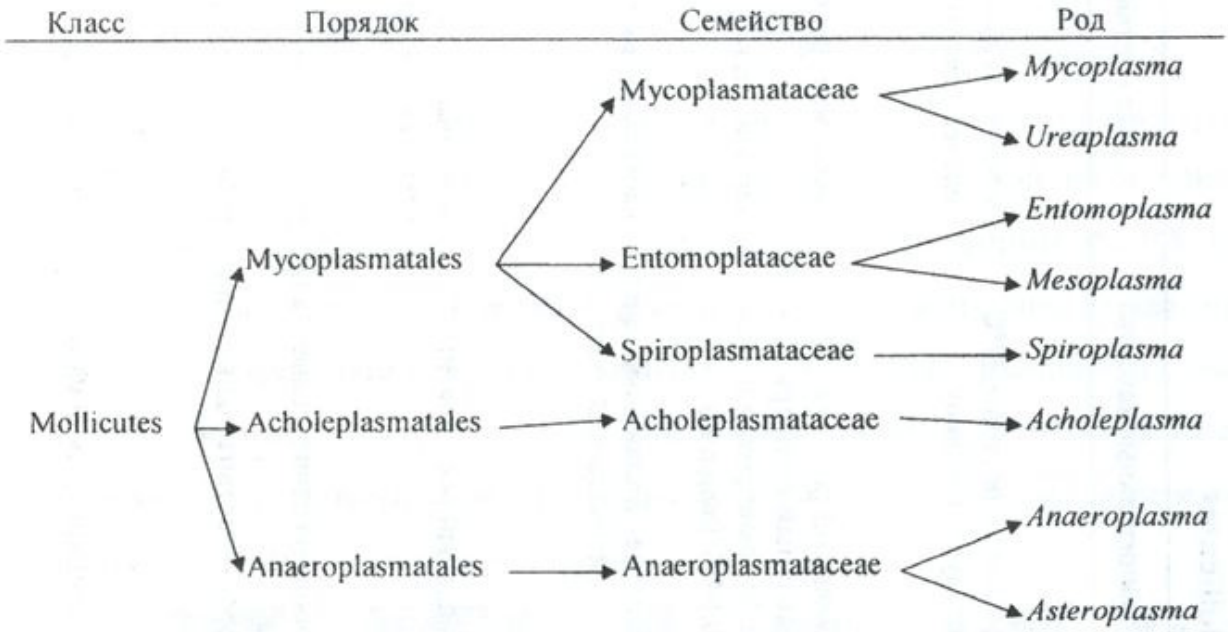


Рис. 2. Таксономия микоплазм (по: Razin & Herrmann, 2002).

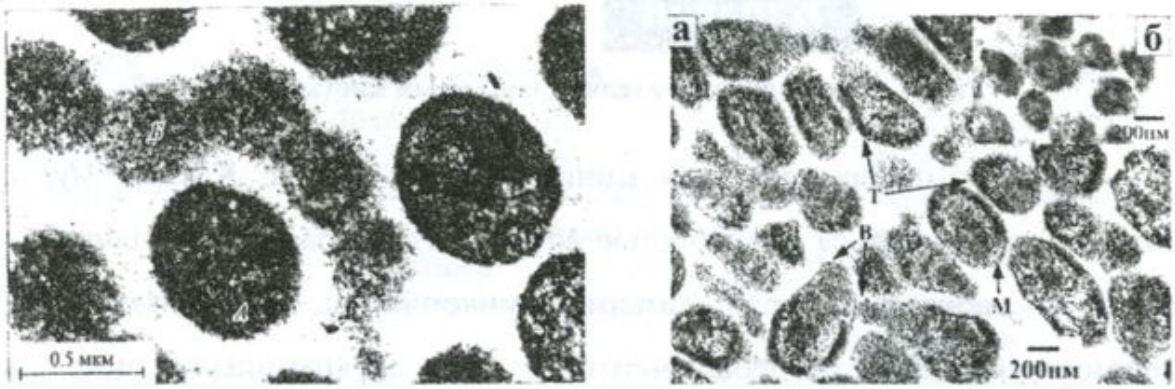
Существующая классификация *Mollicutes*, основанная на морфологических, биохимических, пищевых и некоторых других особенностях микоплазм, а также на данных о нуклеотидных последовательностях филогенетических маркеров микоплазм, лишь отчасти совпадает с современными представлениями о филогении этих бактерий. У систематиков нет сомнений, что таксономия микроорганизмов, основанная на молекулярно-генетических данных, разумна и целесообразна, но пришло ли время радикальных перемен в бактериальной таксономии, пока обсуждается. Однако даже если учесть, что принятая систематика микоплазм несовершенна и будущие исследования позволят перегруппировать существующие таксоны, постоянным источником таксономических трудностей остается феноменально высокий темп реорганизации генома микоплазм. Возможно, процессы видообразования у микоплазм могут происходить в очень короткие временные отрезки, не привычные для представлений об эволюционных темпах изменчивости и видообразования бактерий.

Таблица 1

Основные свойства и таксономия класса Mollicutes

Классификация	Число видов	Размер генома (т.н.п)	Моль % G+C	Потребность в холестероле	Отличительные качества	Среда обитания
Порядок I: Mycoplastmatales						
Семейство I: Mycoplasmataceae						
Род *Mycoplasma*	102	580-1350	23-40	есть	оптимальный рост при 37°C	человек, животные
Род II: *Ureaplasma*	6	760-1170	27-30	есть	гидролизует мочевину	человек, животные
Порядок II: *Entomoplasmatales*						
Семейство I: *Enlomoplasmataceae*						
Род I: *Entomoplasma*	5	790-1140	27-29	есть	оптимальный рост при 37°C	насекомые, растения
Род II: *Mesoplasma*	12	870-1100	27-30	нет	оптимальный рост при 37^0C в среде без сыворотки необходим 0.04% Tween 80	насекомые, растения
Семейство II: *Spiroplasmataceae*						
Род I: *Spiroplasma*	33	780-2220	24-31	есть	спиральные подвижные филаменты; оптимальный рост при 30-37^0C	насекомые, растения
Порядок III *Acholeplasmatales*						
Семейство I: *Acholeplasmataceae*						
Род: *Acholeplasma*	13	1500-1650	26-36	нет	оптимальный рост при 30-37^0	животные, насекомые некоторые растения,
Порядок IV: *Anaeroplasmatales*						
Семейство: *Anaeroplasmataceae*						
Род I: *Anaeroplasma*	4	1500-1600	29-4	есть	кислород-чувствительные анаэробы	рубец овец и коров
Род II: *Asteroleplasma*	1	1500	50	нет	кислород-чувствительные анаэробы	рубец овец и коров
Неидентифицированный таксономический статус						
Phytoplasma	не установлено	640-1185	23-29	не известно	не культивируются in vitro	насекомые, растения

Клетки микоплазм ограничены лишь плазматической мембраной. Морфология и размеры микоплазм варьируют в зависимости от возраста культуры, условий и сред культивирования. Для большинства видов микоплазм характерна сферическая форма клеток. При этом клетки одной и той же микоплазмы могут быть сферической (или несколько вытянутой) формы 0.3-0.8 мкм в диаметре, но могут образовывать длинные (до 100 мкм), иногда ветвящиеся тяжи, которые, проходя фазу кокковидных структур, распадаются на ряд сферических клеток (рис. 3). Эти превращения являются следствием того, что цитокинез сферических клеток отстает от репликации генома: тяжи и кокковидные структуры мультинуклеоидны.



1 2

Рис. 3. Трансмиссивные микрографии клеток *Acholeplasma laidlawii* (1) и *M.gallisepticum* (2, образующихся на полноценной питательной среде Эдварда (а) и при ограничении субстрата (б)), полученные сотрудниками лаборатории молекулярных основ патогенеза Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

А- сферическая (нормальная) клетка микоплазмы, Б – мультинуклеоидные тяжи,
Т – тубулиноподобные структуры, В – терминальные образования, М – клеточная мембрана.

Микоплазмы не образуют так называемых покоящихся форм или спор. Подобно другим неспорообразующим бактериям микоплазмы в неблагоприятных условиях переходят в "некультивируемое, но жизнеспособное" состояние и образуют ультрамикроформы - сферические клетки размером 0.1-0.2 мкм (рис. 3б). Некоторые виды микоплазм обладают скользящей подвижностью. Клетки таких микоплазм имеют грушевидную форму, особые полярные структуры и цитоскелетоподобные образования (рис. 3а). На основании самой подвижной микоплазмы - *M.mobile* – группа японских ученых во главе с Юичи Хирацука (Yuichi Hiratsuka) создала нанодвигатель (рис. 4).

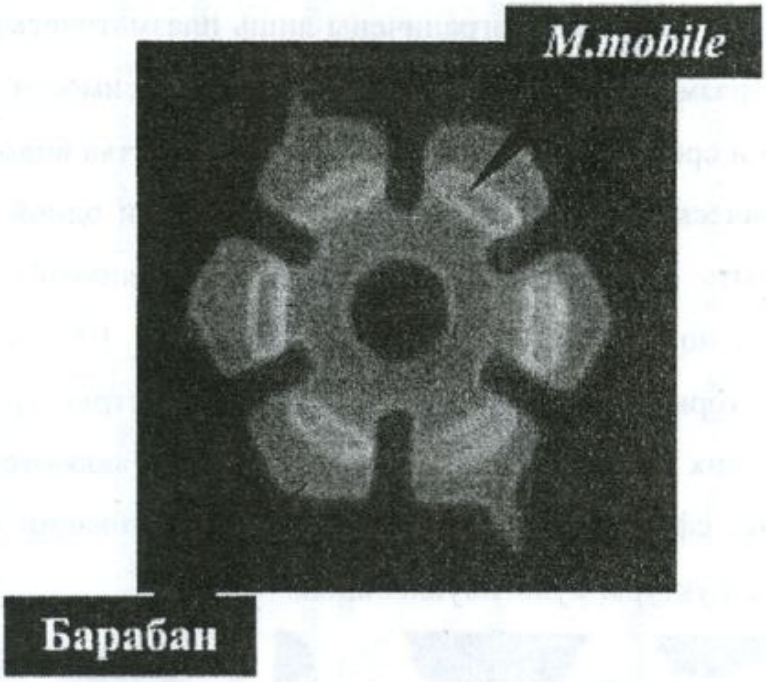


Рис. 4. Ротор нанодвигателя, вращаемый клетками *M.mobile*.

Микоплазмы вращают вал миниатюрного мотора. Клетки *Mycoplasma mobile* могут двигаться со скоростью до 1,8 сантиметра в час. Топливом мотора является глюкоза, которой питаются микоплазмы. Микоплазмы вращают 20 тысяч кварцевых роторов, смонтированных на кремниевом чипе. Каждый мотор имеет диаметр около 20 нанометров, то есть впятеро меньше, чем человеческий волос. Микоплазмы прикреплены к ротору микромотора с помощью витамина B7 и движутся по специальным направляющим из гликозилированных белковых молекул. Это первая нанотехнологическая разработка, включающая механическое устройство и живой организм. Скорость вращения вала двигателя составляет от 1,5 до 2,6 оборотов в минуту. Разработку японских ученых планируют использовать в наномашинах для генерации малых токов или в качестве привода микроскопических насосов.

Основные черты отличия микоплазм от других бактерий перечислены в таблице 2. Микоплазмы могут быть определены как одноклеточные хемогетеротрофы со сложными пищевыми потребностями, лишенные клеточной стенки. Сложность их пищевых потребностей соответствует простоте их организации, то есть информационной ограниченности генома, и, следовательно, ограниченным биосинтетическим возможностям. Количество генетической информации,

которым располагают микоплазмы, вероятно, находится на нижнем пределе для независимого существования бактерий.

Таблица 2

Свойства, отличающие представителей класса Mollicutes от других эубактерий

Признак	Представители класса Mollicutes (микоплазмы)	Другие эубактерии
Клеточная стенка	Отсутствует	Присутствует
Плазматическая мембрана	Холестерол присутствует у большинства видов	Холестерол отсутствует
Размер генома	580-2200 т.п.н.	1050-10000 т.н.п.
Содержание G+C в геноме	23-40 моль%	25-75 моль%
Количество оперонов рРНК	1-2*	1-10
Длина 5S рРНК	104-113 нуклеотида	>114 нуклеотидов
Количество генов тРНК	30 (*M.capricolum*), 33 (*M.pneumoniae*)	84 (*B.subtilis*), 86 (*E. coli*)
Смысл кодона UGA	Кодирование триптофана у *Mycoplasma, Ureaplasma, Spiroplasma, Mesoplasma*	Терминирующий кодон
РНК-полимераза	Устойчивы к рифампицину	Чувствительны к рифампицину

*- 3 рРНК оперона у *Mesoplasma lactucae*

Ограниченные метаболические возможности обусловливают зависимость микоплазм от клеток хозяина, что определяет трудности культивирования этих бактерий на искусственных питательных средах.

Для культивирования клеток микоплазм используют среды весьма сложного состава. Бессывороточные среды вполне определенного состава предложены пока только для двух микоплазм - *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Все остальные микоплазмы выращивают на средах, содержащих сыворотку крови (лошадей, КРС или кроликов), а также дрожжевой экстракт, пептон и мясные бульоны, т.е. компоненты, которые никак нельзя назвать вполне определенными.

Среда Эдварда

(по: Hayflick, 1965, с модификациями)

Инфузат сердца (безводный, Difco) .....2.85 г

Лошадиная сыворотка.....20 мл

Свежий дрожжевой экстракт (2%-ный).....10 мл

ДНК тимуса теленка (0.2%-ная).....1.2 мл

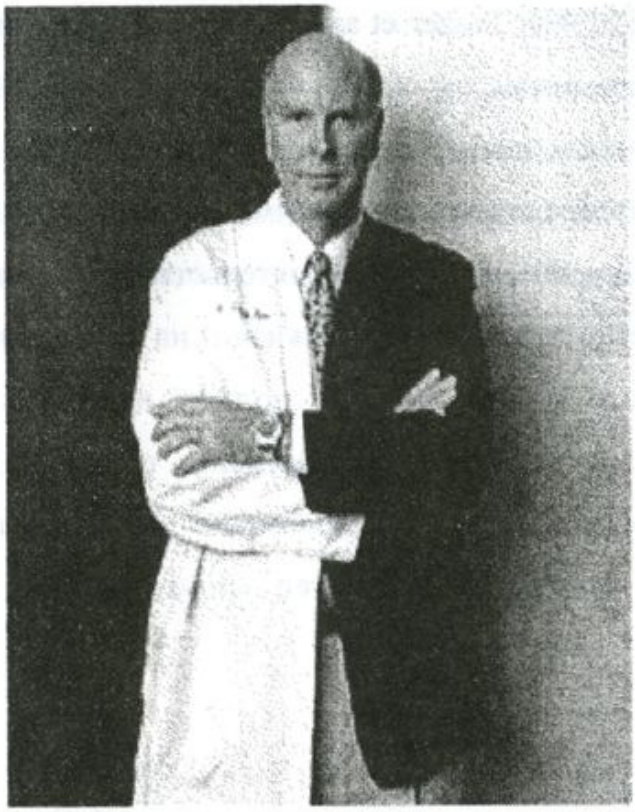
Бензилпенициллин (2 10^5 ед/мл).....0.25 мл

Дистиллированная вода.....90 мл

Сложности культивирования микоплазм на искусственных питательных средах в значительной мере определяют неэффективность использования классических микробиологических методов для обнаружения этих микроорганизмов, а также трудности проведения исследований их клеточной и молекулярной биологии.

Пониманию молекулярной и клеточной биологии представителей класса Mollicutes в значительной мере способствовала успешная реализация геномно-протеомных проектов в отношении ряда микоплазм.

Как известно, первым был прочтен геном бактерии *Haemophilus influenzae* длиной 1830 тыс. н.п. (Fleischmann et al., 1995) в институте Геномных исследований (TIGR) под руководством профессора Крейга Вентера (Craig Venter), который является одним из главных исполнителей международной программы "Геном человека".



Проф. Крейг Вентер -

автор расшифрованных геномов ряда микроорганизмов, в том числе микоплазм, руководитель проекта по созданию искусственной формы жизни на основе *Mycoplasma genitalium*.

Почти одновременно сотрудники этого института приступили к расшифровке генома самой малой микоплазмы - *M.genitalium*. Эффективность работы команды по секвенированию генома *M.genitalium* была в значительной мере обеспечена мощью секвенирующего и информационного оборудования TIGR.

Первая экстракция ДНК из клеток *M.genitalium* была выполнена в начале января 1995, а результаты полной нуклеотидной последовательности генома и ее анализ были представлены в виде статьи в журнале Science уже к 11 августа 1995 (Fraser at al., 1995). В значительной мере это стало возможным в результате применения стратегии "shotgun" к целому геному без предварительного

построения и упорядочения космид. Выстраивание тысяч фрагментов ДНК в нужном порядке было осуществлено с помощью специальной компьюторной программы, разработанной в TIGR, а предсказание кодирующих районов генома было сделано в результате использования комплекта программ Gene Mark с учетом всех имевшихся к тому времени баз данных (Franzoso et al., 1994; Fleischmann et al., 1995; Frazer et al., 1995). Геном *M.genitalium,* являясь самым малым среди микоплазм (и, таким образом, самым малым среди известных свободноживущих организмов), представляет особый интерес. Предполагается, что геном *M.genitalium* содержит минимальный набор генов, необходимых для независимой жизни. Именно это обстоятельство определило выбор *M.genitalium* для создания "искусственной формы жизни" на основе микоплазмы.

Вскоре после опубликования полной нуклеотидной последовательности геномов *M.genitalium* и *H.influenze* появились полные последовательности геномов других микоплазм и эубактерий, что открыло возможность сравнительной геномике (табл. 3, рис. 5 и 6).

Таблица 3.

Сравнительный анализ некоторых свойств геномов ряда микоплазм и бактерий

Свойства	*H.influenzae*	*M.pneumoniae*	*M.genitalium*	*U.urealyticum*	*E.coli*
Количество п.н.о.	1830,137	816,394	580,070	751,719	4,639,222
Содержание Г+Ц (мол %)	38	40	32	25,5	50
Количество кодирующих ОРС	1703	677	479	613	4288
Количество идентифицированных ОРС	1408	603	468		2659
Количество неопределенных по Функциям ОРС	295	74	11		1629

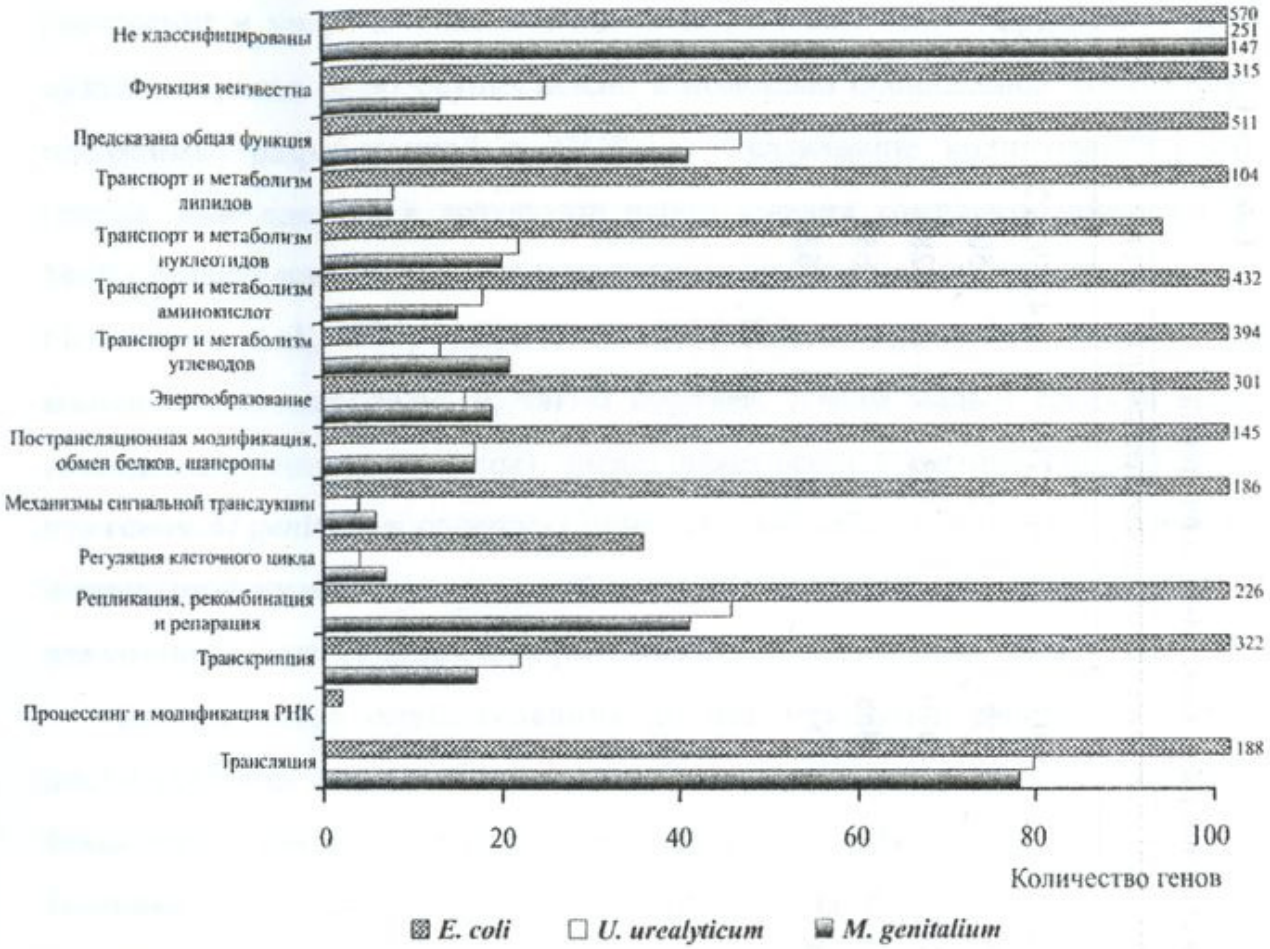


Рис. 5. Гены, выявленные у *E.coli, U.urealyticum и M.genitalium*, в результате определения полных нуклеотидных последовательностей геномов этих бактерий.

Результаты анализа полностью прочтенных геномов соответствуют представлению о том, что геномы микоплазм редуцированы по сравнению с геномом бактерии-предка, который имел размеры в несколько миллионов пар оснований. Очевидна полная потеря некоторых анаболических путей и большого числа генов, нужных для синтеза комплекса стуктур, составляющих клеточную стенку. Кроме того, для таких процессов, как репарация и рекомбинация ДНК, клеточное деление и секреция белков, число найденных генов существенно меньше, чем у других бактерий.

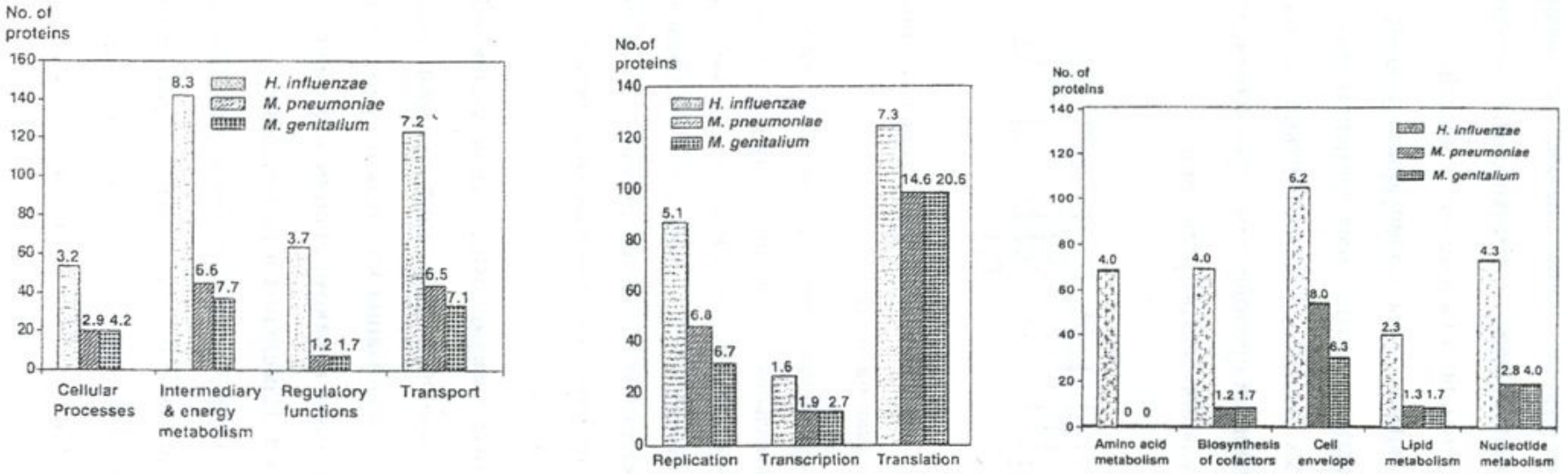


Рис. 6. Гены клеточных процессов, метаболических путей и регуляторных функций в геномах *H.influenzae*, *M.pneumoniae*, *M.genitalium*.

Числа над столбиками соответствуют проценту от общего количества идентифицированных генов.

Однако несмотря на ограниченный размер генома, генетическая информация, которой располагают микоплазмы, обеспечивает не только синтез необходимой для роста клетки метаболической системы, но и уклонение от воздействия защитных механизмов организма-хозяина. Многие гены, кодирующие важные поверхностные антигены микоплазм, содержат повторяющиеся элементы (рис. 6). Эти элементы в генах иммунодоминантных белков микоплазм можно рассматривать как генетический инструмент, позволяющий проводить быстрые изменения антигенных детерминант в клеточных популяциях микроорганизмов.

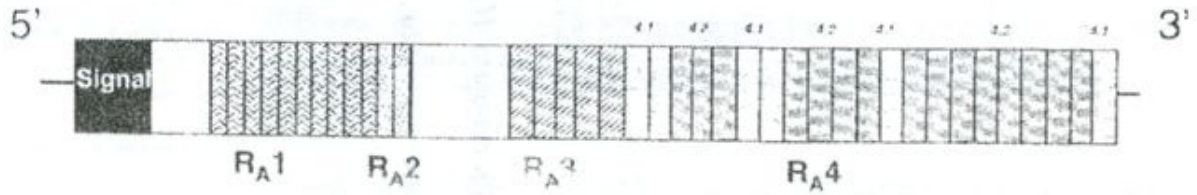


Рис.7. Схематичное представление структурных особенностей генов иммуннодоминантных белков микоплазм.

На рисунке представлена структура гена липопротеина VspA *Mycoplasma bovis*. Открытая рамка считывания показана как прямоугольник, состоящий из внутренних блоков. Различные повторяющиеся последовательности - R_A1, R_A2, R_A3 R_A4 представляют четыре повторяющиеся региона, кодирующих последовательности аминокислот с различной периодичностью - 6, 6 и 8 аминокислот, соответственно. Суперповторяющиеся единицы внутри региона R_A4 обозначены $R_A4.1$ и $R_A4.2$. Сигнальная последовательность состоит из 25 аминокислот соответствующего сигнального пептида.

Гены, кодирующие поверхностные иммунодоминантные белки образуют семейства. Нуклеотидные последовательности этих генов содержат различные классы повторяющихся элементов, реорганизация которых по типу "выщепления-встраивания" в процессе репликации и рекомбинации определяет вариабельность продуктов экспрессии генов. Изменения в промоторных зонах соответствующих генов, также обусловленные "выщеплением-встраиванием" ряда нуклеотидных последовательностей, вызывают "переключение фаз" активности гена (табл. 4, рис. 8). В результате вышеуказанных процессов (в соответствии с законами комбинаторики) могут возникать миллионы вариантов продуктов

экспрессии генов адгезинов – основных поверхностных антигенных детерминант, судьба которых определяется естественным отбором.

Таблица 4.

Генетические особенности систем вариации поверхностных антигенов у молликут

Микоплазмы	Белки	Участвующие гены	Элемент, вовлеченный в вариабельность	Уровень регуляции
M.hyorhinis	Vlp	семейство генов	гомополимерный участок, поли-А	контроль транскрипции
M.bovis	Vsp	семейство генов	транспозиция ДНК	контроль транскрипции
M.gallisepticum	pMGA	семейство генов	олигонуклеотидные повторы $(ГАА)_n$	контроль транскрипции
M.pulmonis	Vsa	семейство генов	инверсия ДНК	контроль транскрипции
M.hominis	Vaa	одна копия	гомополимерный участок, поли-А	сдвиг рамки считывания при трансляции
M. fermentans	P78	часть оперона	гомополимерный участок, поли-А	сдвиг рамки считывания при трансляции

В организме человека и млекопитающих антитела направляют селекцию в популяции микоплазм, способствуя отбору инфекционных агентов, в отношении основных поверхностных антигенных детерминант которых иммунная система оказывается толерантной. Такие инфекционные агенты могут успешно колонизировать клетки тканей макроорганизма и обусловливать развитие латентных персистентных инфекций.

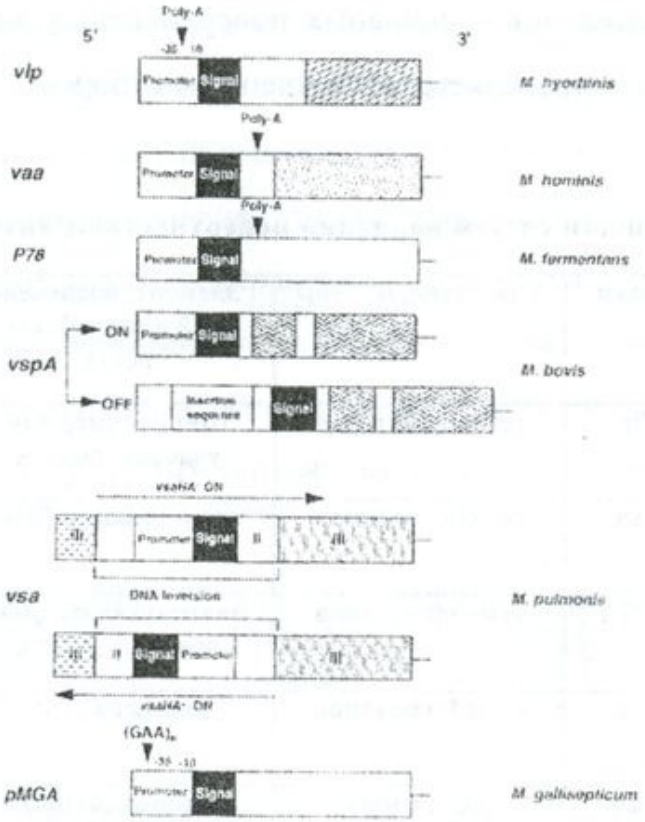


Рис. 8. Схематическое представление регуляторных и структурных особенностей систем антигенной вариации у микоплазм.

Система распознавания и соответствующие виды микоплазм обозначены, соответственно, слева и справа. Темный закрашенный сегмент, обозначенный как «сигнальный», содержит видоспецифичную аминокислотную последовательность липопротеинового сигнального пептида. Различные заштрихованные сегменты представляют собой системоспецифичные внутрирамочные повторяющиеся последовательности. Стрелкой указано расположение гомополимерной последовательности повторяющихся аденинов (поли-А) или олигонуклеотидные повторы $(ГАА)_n$ внутри промоторного района (*vlp, pMGA*) или внутри экзона (*vaa, P78*). Указаны два гена *vsp* из двух клинических изолятов *M.bovis*, демонстрирующих идущую и приостановленную экспрессию вариабельного поверхностного липопротеина VspA. Геномный фрагмент, внедренный в промоторную область *vspA*, приводящий к прекращению экспрессии, представлен в виде заштрихованной области и обозначен как «инсерционная последовательность». Также на рисунке указаны два гена *vsa*, изолированные из двух вариантов *M. pulmonis*, проявляющих фенотипы $VsaHA^-$ или $VsaHA^+$. В скобках указаны хромосомные фрагменты, инвертированные при переходе $VsaHA^-$ <-> HA^+. Направление экспрессии гена *vsa* в каждом варианте указано стрелкой.

Реализация транскриптомно-протеомных проектов в отношении ряда микоплазм определила возможность выявления особенностей экспрессии белков и описания возможных клеточных реакций бактерий в разных условиях их жизни. Впервые подробную схему транскриптомно-протеомного анализа микоплазм (*M.pneumoniae*) представили Sh. Razin и R. Herrmann (2002).

Проф. Шмуль Разин
(Hadaas Medical Schools, Yerusalem, Israel) выдающийся микоплазмолог, специализирующийся в области клеточной и молекулярной биологии микоплазм.

Проф. Ричард Херрманн
(Heidelberg University, Germany) ведущий молекулярный биолог-микоплазмолог, руководитель проекта по расшифровке генома *M.pneumoniae*

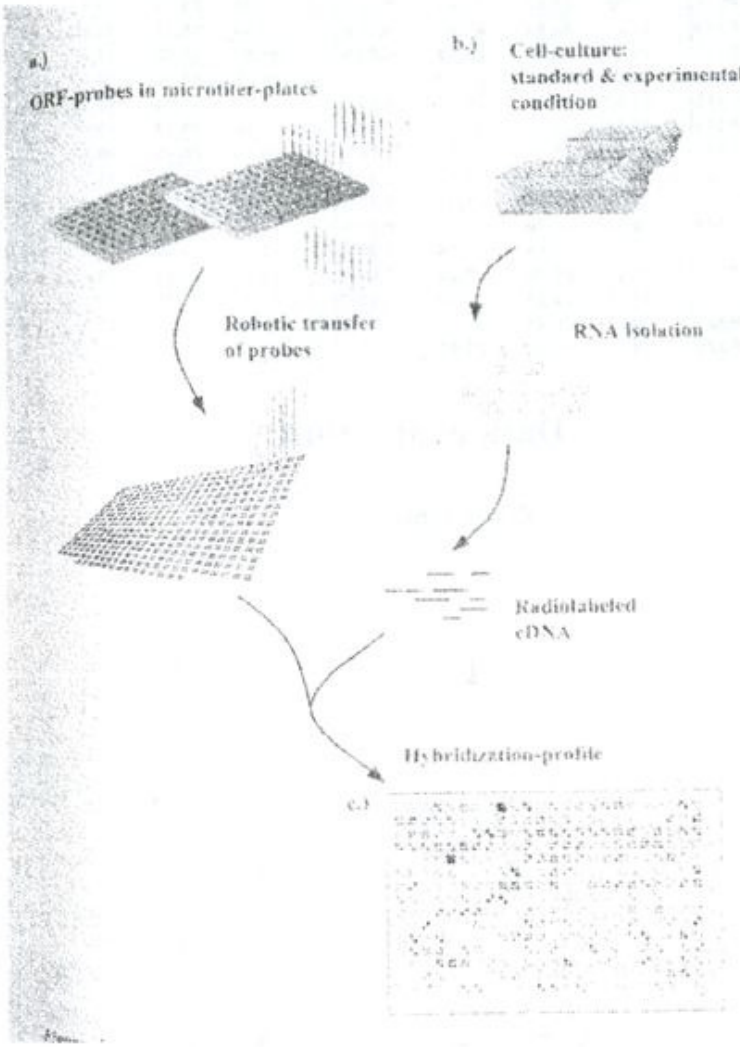
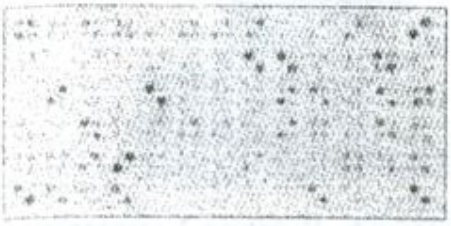


Рис. 9. Схема транскриптомного анализа (по: Razin & Herrmann, 2002).

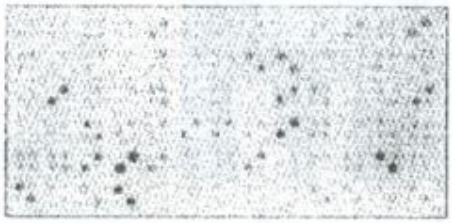
a) создание микрочипового фильтра: ОРС-пробы собираются на плату и переносятся на нейлоновые мембраны; b) синтез проб: клетки выращиваются в различных условиях, выделяется РНК клеток и подвергается обратной транскрипции; c) микрочиповый профиль: меченая кДНК гибридизуется с микрочиповым фильтром.

Profile evaluation

32°C



HS



Array data

		32°C				HS			
MPN#	ORFMP#	Mean1	Mean2	Average	% of total	Mean1	Mean2	Average	% of total
MPN532	ORFMP310	42,53	45,21	43,87	0,14%	32,69	32,64	32,66	0,17%
MPN531	ORFMP311	27,06	27,03	27,04	0,22%	79,05	73,22	76,13	1,70%
MPN530	ORFMP312	47,25	46,94	46,60	0,10%	34,98	35,17	35,08	0,12%
MPN529	ORFMP313	29,21	30,08	29,65	0,04%	25,53	26,82	26,17	0,10%
MPN528	ORFMP314	28,92	28,87	28,89	0,06%	21,28	20,50	20,89	0,07%
MPN527	ORFMP315	25,82	25,42	25,62	0,03%	18,73	17,41	18,07	0,04%
MPN526	ORFMP316	37,64	36,83	37,24	0,03%	25,84	25,13	25,49	0,06%
MPN525	ORFMP317	29,02	30,97	29,99	0,02%	20,43	20,95	20,69	0,05%
MPN524	ORFMP318	29,12	29,14	29,13	0,16%	21,41	21,81	21,61	0,18%
MPN523	ORFMP319	32,29	30,01	31,15	0,18%	47,63	43,58	45,60	0,32%
MPN522	ORFMP320	28,02	27,10	27,56	0,03%	17,65	17,82	17,63	0,02%
MPN521	ORFMP321	27,45	28,04	27,74	0,06%	20,05	19,58	19,81	0,05%
MPN520	ORFMP322	27,51	27,26	27,39	0,04%	19,16	20,21	19,68	0,08%
MPN519	ORFMP323	23,34	22,81	23,08	0,02%	17,97	16,32	17,15	0,02%
MPN518	ORFMP324	24,85	25,45	25,15	0,42%	17,52	16,76	17,14	9,42%
MPN517	ORFMP325	23,43	24,22	23,83	0,14%	19,19	18,14	18,66	0,18%

Data evaluation

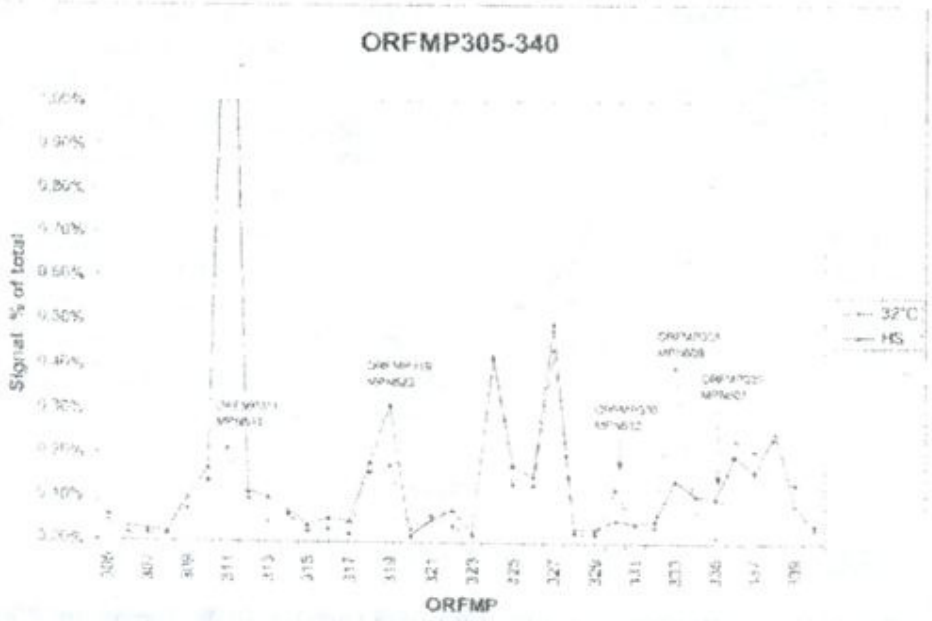


Рис. 10. Транскриптомный анализ (по: Razin & Herrmann, 2002).

Сравнение двух экспериментальных условий (32^{0}C и тепловой шок (HS) - 15 мин при 43^{0}C): показаны части из различных профилей микрочипов. Пример приведен из анализа *M.pneumoniae*.

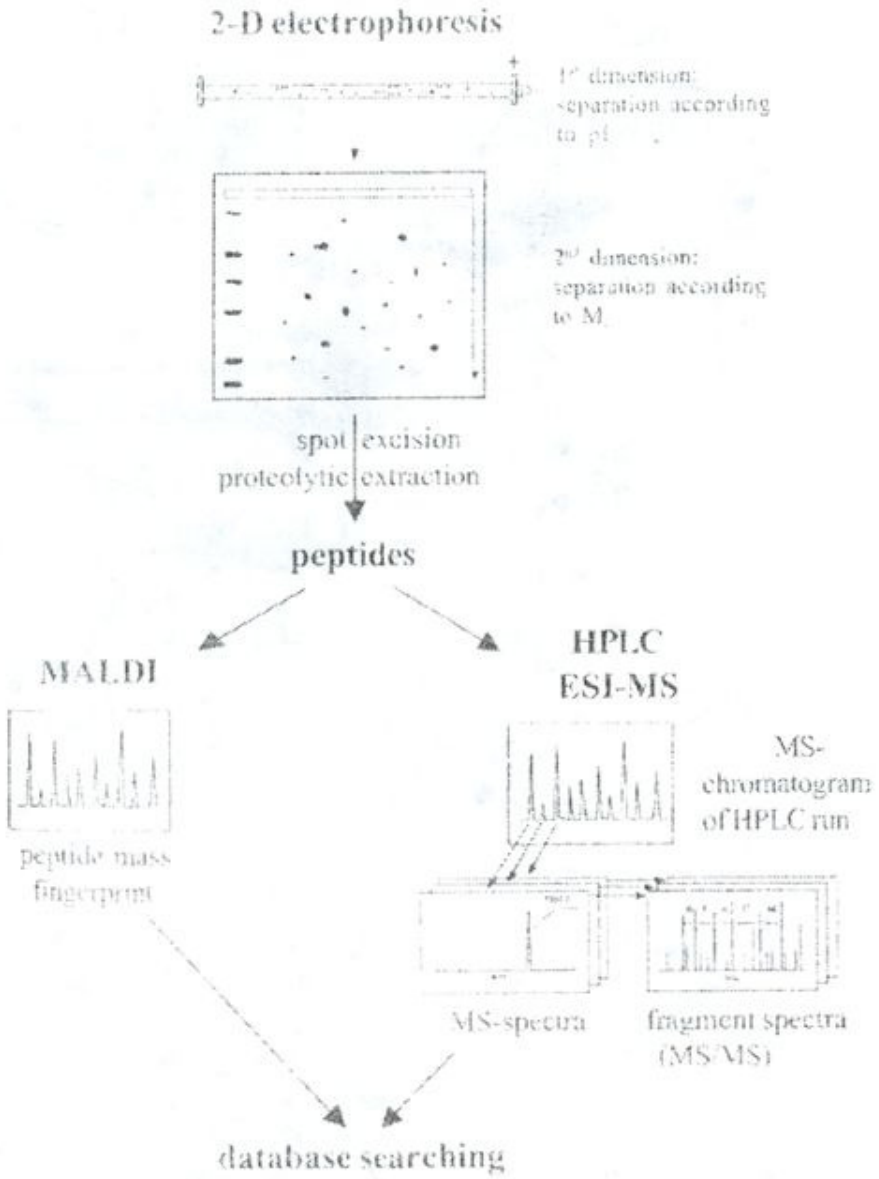


Рис. 11. Схема протеомного анализа (по: Razin & Herrmann, 2002).

Идентификация белков, разделенных в одномерном и двумерном гелях с помощью масс-спектрометрии – MALDI – масс-спектрометрия с применением ионизации лазерной десорбцией при исследовании матрицы и ESI-MS – масс-спектрометрическое определение аминокислотной последовательности пептидов и белковых фрагментов методом электроспрейной ионизации.

После вырезания пятен или полос из геля белки подвергаются обработке трипсином. Два различных метода масс-спектрометрии могут быть использованы. При MALDI масс-спектрометрии массы трипсинизированных пептидов определяются и используются для поиска данных (метод построения пептидных карт). При HPLC-ESI/MS дополнительная информация по последовательности трипсинизированных пептидов позволяет повысить достоверность результатов.

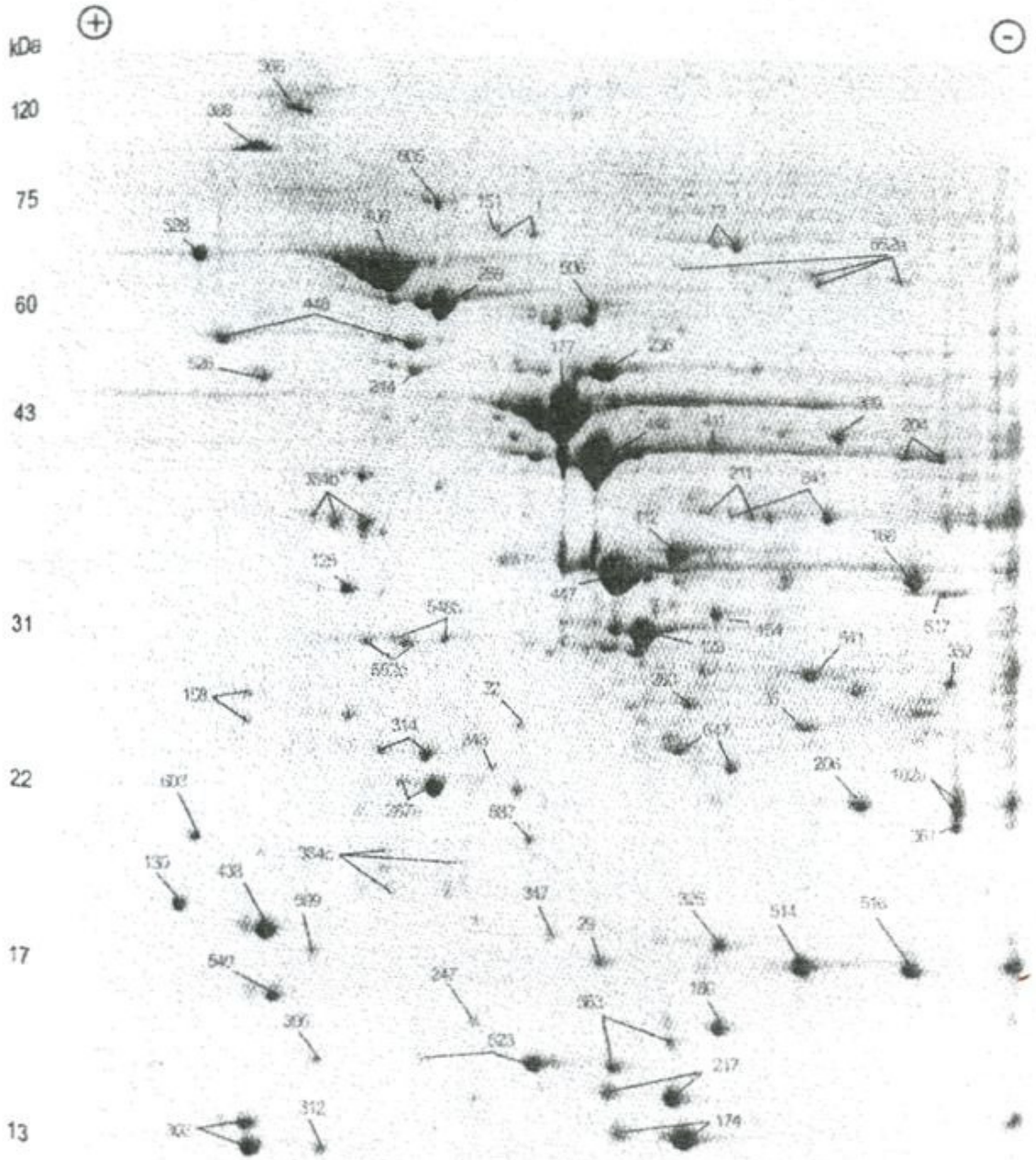


Рис. 12. Разделение полипептидов *M.pneumoniae* в геле с помощью двумерного электрофореза (по: Razin & Herrmann, 2002).

Полностью растворимый белковый экстракт разделен в иммобилизированном градиенте pH от 3 до 10 при первом разделении и в 12.5% акриламидном додецилсульфатном геле при втором разделении. Белковые пятна визуализируются с помощью окрашивания коллоидным Кумасси-голубым.

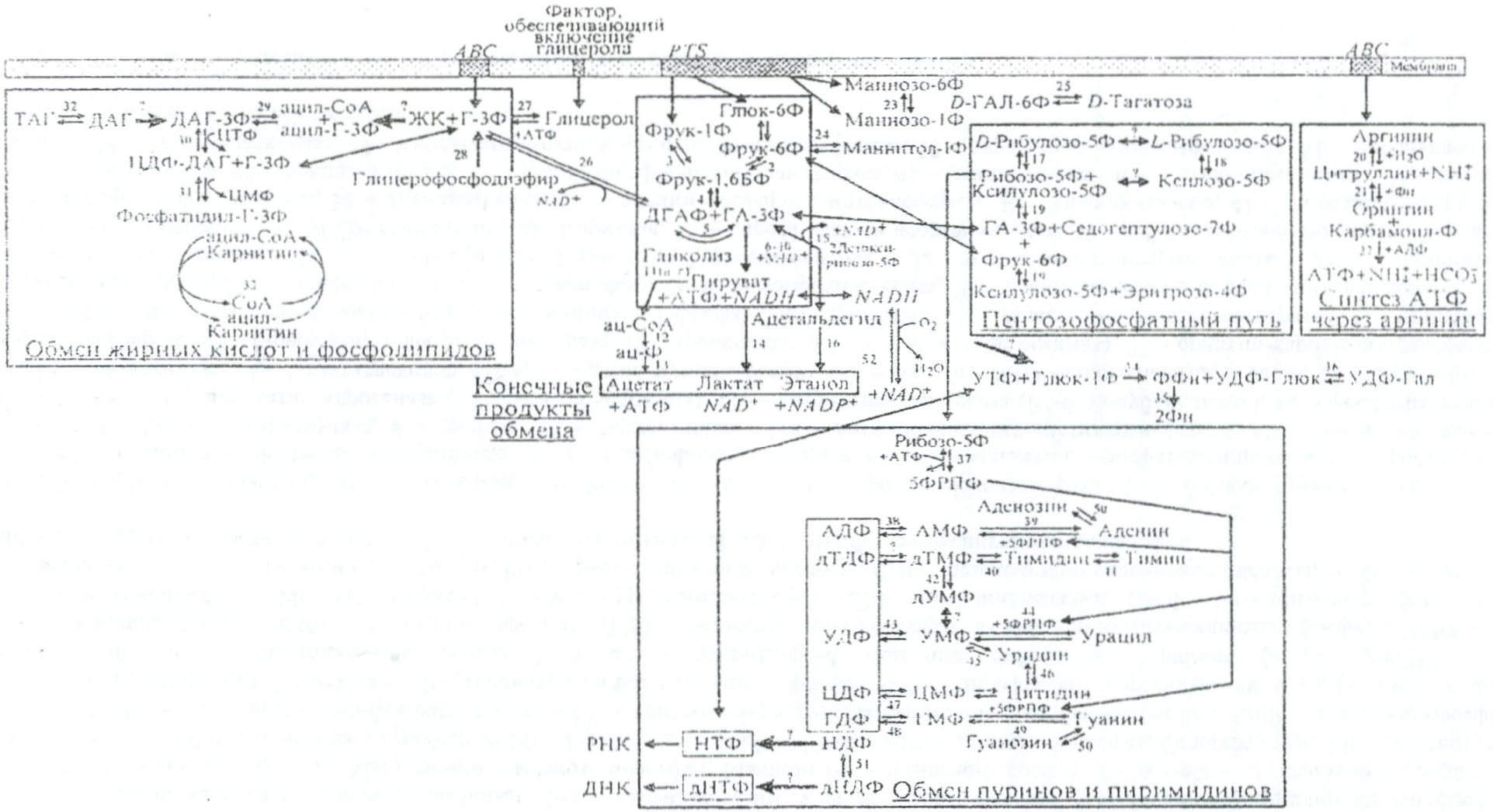


Рис. 13. Схема метаболических путей *Mycoplasma pneumoniae*, составленная на основе данных о нуклеотидных последовательностей генома и транскриптомного анализа микоплазмы (по: Himmelreich et al., 1996)

ТАГ – триацилглицерид; ДАГ – диацилглицирид; ДАГ-3Ф – дицилглицерол-3-фосфат; ацил-СоА – ацил-коэнзим А; ацил-Г-3Ф – ацилглицерол-3-фосфат; ЦДФ-ДАГ – цитидиндифосфат-диацилглицерол; Фосфатидил-Г-3Ф – фосфатидилглицерол-3-фосфат; Г-3Ф – глицерол-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; 2Дезоксирибозо-5Ф – 2'-дезоксирибозо-5-фосфат; *NADH* – никотинамидаденин-динуклеотид восстановленный; СоА – ацетил-коэнзим А; ац-Ф – ацетилфосфат; *NADP* –никотинамиддинуклеотидфосфат; Манитол-1Ф – манитол-1-фосфат; Маннозо-6Ф – маннозо-6-фосфат; Маннозо-1Ф – маннозо-1-фосфат; *D*-ГАЛ-6Ф – *D*-галактозо-6-фосфат; *D*-рибулозо-5Ф – *D*-рибулозо-5-фосфат; *L*-рибулозо-5Ф – *L*-рибулозо-5-фосфат; Ксилозо-5Ф – ксилозо-5-фосфат; Седогептулозо-7Ф – седогептулозо-7-фосфат; Фрук-6Ф – фруктозо-6-фосфат; Эритрозо-4Ф – эритрозо-4-фосфат; Карбамоил-Ф – карбамоилфосфат; АДФ – аденозиндифосфат; АТФ – аденозинтрифосфат; УТФ+Глюк-1Ф – уридинтрифосфат + глюкозо-1-фосфат; ФФн – пирофосфат неорганический; Фн – фосфат неорганический; УДФ-Глюк – уридиндифосфатглюкоза; УДФ-Гал – уридиндифосфатгалактоза; Рибозо-5Ф – рибозо-5-фосфат; 5ФРПФ – 5-фосфорибозилпирофосфат; 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.

Перечень ферментов, представленных на схеме метаболических путей: 1 – фосфоглюкоизомераза, 2 – 6-фосфофруктокиназа, 3 – 1-фосфофруктокиназа, 4 – фруктозобисфосфатальдолаза, 5 – триозофосфатизомераза, 6 – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, 7 – фосфоглицераткиназа, 8 – фосфоглицератмутаза, 9 – энолаза, 10 – пируваткиназа, 11а – дигидролипоамид-ацетилтрансфераза, 11б – дигидролипоамиддигидрогеназа, 11в – пируватдегидрогеназа (Е1-альфа-субъединица), 11г – пируватдегидрогеназа (Е1-бета-субъединица), 12 – фосфотрансацетилаза, 13 – ацетаткиназа, 14 – *L*-лактатдегидрогеназа, 15 – дезоксирибозофосфат-альдолаза, 16 – *NAD*$^+$-алкогольдегидрогеназа, 17 – *D*-рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза, 18 – *L*-рибулозо-5-фосфат-4-эпимераза, 19 – транскетолаза 1, 20 – аргининдезиминаза, 21 – орнитин-карбомоилтрансфераза, 22 – карбаматкиназа, 23 – фосфоманномутаза, 24 – маннитол-1-фосфат-5-дегидрогеназа, 25 – галактозо-6-фосфат-изомераза, 26 – глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа, 27 – глицеролкиназа, 28 – глицеролфосфодиэфир-фосфодиэстераза, 29 – 1-ацилглицерол-3-фосфат-ацилтрансфераза, 30 – *CDP*-диглициридсинтетаза, 31 – 3-фосфатидил-1'-глицерол-3'-фосфат-синтаза, 32 – триацилглицерол-липаза, 33 – карнитин-пальмитоилтрансфераза II, 34 – *UDP*-глюкоза-пирофосфорилаза, 35 – пирофосфатаза неорганическая, 36 – *UDP*-глюкоза-4-эпимераза, 37 – фосфорибозилпирофосфатсинтетаза, 38 – аденилаткиназа, 39 – аденин-фосфорибозилтрансфераза, 40 – тимидинкиназа, 41 – тимидинфосфорилаза, 42 – тимидилатсинтаза, 43 – уридилаткиназа, 44 – урацил-фосфорибозилтрансфераза, 45 – уридинкиназа, 46 – цитидиндезаминаза, 47 – цитидилаткиназа, 48 – 5'-гуанилаткиназа, 49 – гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза, 50 – пурин-нуклеозидфосфорилаза, 51 – рибонуклеозиддифосфатредуктаза, 52 – *NADH*-оксидаза.

Обозначение $\xrightarrow{?}$ соответствует отсутствию ферментов (и их генов), определяющих реакции

Микоплазмы весьма удобны для протеомного анализа, так как большая часть их белков может быть разделена, проанализирована и идентифицирована при двумерном электрофорезе. Ограничения протеомного подхода состоят в следующем: 1) протеомный анализ эффективен только в отношении белков, для которых известна структура их генов; 2) вопрос о функции продукта данного гена может быть решен со всей определенностью только в результате комплексных исследований, включая анализ ферментативной активности, генетические эксперименты с направленным мутагенезом и структурный анализ белка; 3) разделение белков двумерным электрофорезом в геле оптимально только для малых организмов, таких как микоплазмы; 4) белковые молекулы, представленные небольшим числом копий, могут быть потеряны из-за низкой разрешающей способности двумерного электрофореза в геле; 5) белки с изоэлектрической точкой более 10 обычно не разделяются; 6) не все белки клетки экспрессируются в данное время (рис. 14).

Рис. 14. Белки клеток *A.laidlawii* PG8, культивированных в оптимальных (А) и стрессовых (Б) условиях роста, выявленные при 2D-электрофоретическом разделении (с помощью MALDI-TOF/TOF).
Данные получены сотрудниками лаборатории протеомных исследований (руководитель проф. В.М.Говорун) НИИ Физико-химической медицины Росздрава и лаборатории молекулярных основ патогенеза (руководитель проф. В.М.Чернов) Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН в рамках совместных исследований.

Полученные к настоящему времени данные о биологии микоплазм свидетельствуют, что постижение "логики жизни минимальной клетки" в терминах молекулярной биологии предполагает сравнительное геномно-транскриптомно-протеомное профилирование клеток микоплазм в разных условиях роста, в том числе при взаимодействии их с клетками эукариот – проект,

над реализацией которого работает группа российских исследователей – Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казанского государственного университета, НИИ физико-химической медицины Росздрава РФ и Института цитологии РАН .

Базы данных по геномике, транскриптомике и протеомике микоплазм постоянно пополняются новыми сведениями. В 2007 году российские исследователи – сотрудники отдела молекулярной биологии и генетики (НИИ физико-химической медицины Росздрава) под руководством профессора В.М.Говоруна расшифровали геном "вездесущей" микоплазмы – *Acholeplasma laidlawii*, инфицирующей клетки человека, животных, растений, основного контаминанта клеточных культур. Нуклеотидная последовательность генома этой микоплазмы представлена на сайте: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez

Таблица 5.

Основные информационные ресурсы по геномике микоплазм

Название базы данных	Тип базы данных и сервисы	Страна	Сайт в интернете	Основное содержание
Базы данных общего назначения				
«Ресурсный центр по биоинформатике микоплазм» (Mycoplasma Bioinformatics Resource Center)	Данные сиквенса, анализ генов и полных геномов	США	http://mycoplasma.genome.uab.edu	Полный геном *M.hypopneumoniae*
«Геноскоп» (Genoscope)	Данные сиквенса различных организмов	Франция	http://www.genoscope.cns.fr/externe/English/corps_anglais.html	Полные геномы некоторых микоплазм
«Институт геномных исследований» (TIGR)	Данные сиквенса	Мэриленд, США	www.tigr.org	Геномы *M.genitalium* и более 50 других организмов
«Геномный проект по *M.pneumoniae*» (The M.pneumoniae Genome Project)	Данные сиквенса	Германия	http://www.zmbh.uniheidelberg.de/M_pneumoniae/genome/	Полный геном *M.pneumoniae*
«Энтрез Джин» (Entrez Gene)	Данные сиквенса, доступ к ресурсам BLAST, GenePlot	NCBI, США	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/	Полные геномы некоторых микоплазм
«KEGG ортолоджи» (KEGG Orthology)	Базы данных генов	Япония	http://www.genome.ad.jp/dbgetbin/get_htext?M.genitalium.kegg	Описания *M.genitalium*
«База данных по транспорту в клетке» (TransportDB)	База данных по транспортным мембранным белкам	Мэриленд, США	http://www.membranetransport.org/	База данных по цитоплазматическим мембран-ным транспорт-ным белкам
«Национальная лаборатория Лос Аламоса. Подразде-ление бионаук» Los Alamos National Lab. Bioscience Division	База данных организмов, вызывающих заболевания, передающиеся половым путем	Калифорния США	http://www.stdgen.lanl.gov/	Данные по геному *M.genitalium* и других микроорганизмов
«ДжинКуиз» (GeneQuiz)	Гомологии белковых последовательностей	EMBL, Великобритания	http://jura.ebi.ac.uk:8765/ext-genequiz/	Гомологии белковых последователь-ностей ряда микоплазм
Базы данных научных статей				
« СиЭфЭс рисёч»(CFS Research)	Исследовательские публикации по микоплазмам	США	http://www.cfsresearch.org/mycoplasma/	Общая информация и статьи по микоплазмам

Рекомендуемая литература

Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика // Санкт-Петербург: Наука. 2002. 316 с.

Прозоровский С.В., Раковская И.В., Вульфович Ю.В. Медицинская микоплазмология. М. 1995. 288 с.

Razin Sh., Herrmann R. (Eds). Molecular Biology and Pathogenecity of Mycoplasmas // Plenum Publishers. 2002. 572 p.

Специальный выпуск журнала "Frontiers in Bioscience", 2006. 11, посвященный современным проблемам микоплазмологии

Kevin Dybvig, Z. Cao, C. Todd French, and Huilan Yu. Evidence for Type III Restriction and Modification Systems in *Mycoplasma pulmonis* // JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2007. Vol. 189, No. 6, p. 2197–2202

Katharine R. Cecchini,1,2 Timothy S. Gorton,1,2 and Steven J. Geary1,2 Transcriptional Responses of *Mycoplasma gallisepticum* Strain R in Association with Eukaryotic Cells // JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2007. Vol. 189, No. 16, p. 5803–5807

Kenro Oshima, Hiromi Nishida. Phylogenetic Relationships Among Mycoplasmas Based on the Whole Genomic Information // J Mol Evol (Electronic supplementary material. The online version of this article (doi: 10.1007/s00239-007-9010-3)

Чернова О.А., Чернов В.М., Трушин М.В.

МИКОПЛАЗМОЛОГИЯ

Учебное пособие

Выходит в авторской редакции

Бумага офсетная. Печать ризографическая.
Формат 60x84 1/16. Гарнитура «Таймс». Усл. печ. л. 1,8
Уч.-изд. л. 1,9. Тираж 100 экз. Заказ 42/9

Издательство
Казанского государственного университета

420008, г. Казань, ул. Профессора Нужина, 1/37
тел. 231-53-59, 292-65-60