

УДК 579.8.05

ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ КЛЕТОК *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* PG8 НА ХОЛОДОВОЙ ШОК И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС: ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ И СТРЕСС-РЕАКТИВНЫЕ БЕЛКИ МИКОПЛАЗМЫ

© 2010 г. В. М. Чернов, О. А. Чернова, Е. С. Медведева, А. И. Сорвина,
М. Н. Давыдова, М. А. Рогова, М. В. Серебрякова

Представлено академиком И.А. Тарчевским 24.11.2009 г.

Поступило 27.11.2009 г.

Большой объем экспериментальных и теоретических данных, полученных в разных лабораториях мира за последние годы, значительно расширил представления о биологии микоплазм (класс Mollicutes) – мельчайших бактерий, способных к самостоятельному воспроизведению. Однако в исследовании молекулярных основ адаптации этих микроорганизмов к стрессорам сделаны лишь первые шаги [1]. Уникальным видом микоплазм с точки зрения адаптивных способностей является *Acholeplasma laidlawii*. Эта микоплазма, встречающаяся в почве, компосте и сточных водах, может инфицировать человека, животных, растения и контаминировать клеточные культуры, использующиеся в том числе для производства вирусных вакцин [2]. Реализация вирулентности *A. laidlawii* (инфекционность, инвазивность, токсигенность, персистенция) предполагает успешное преодоление микоплазмой воздействия стрессовых факторов, связанных, прежде всего, с окислительным стрессом и изменениями температуры среды обитания бактерии. Показано, что некоторые стресс-индуцированные белки могут быть основными элементами адаптации к неблагоприятным условиям среды и вирулентности бактерий [3]. Выявление таких белков представляет значительный интерес для фундаментальных и практических исследований молекулярных основ формирования системы “паразит–хозяин” и способов ее контроля.

Протеомный анализ, основанный на методах двумерного электрофореза, масс-спектрометрии и хромато-масс-спектрометрии белков, а также данных расшифрованного генома бактерий, яв-

ляется в настоящее время эффективным инструментом исследований модуляции экспрессии белков микроорганизмов в ответ на разные стрессоры для выяснения молекулярно-генетических основ выживания бактерий в различных условиях среды [4]. Однако в отношении “вездесущей” микоплазмы – *A. laidlawii* – соответствующие исследования не проводились.

Задачей данной работы явилось выявление белков *A. laidlawii* PG8, дифференциально экспрессирующихся в ответ на холодовой шок и окислительный стресс, в результате решения которой впервые представлены данные протеомного анализа клеток микоплазмы, культивируемых в стрессовых условиях – при холодовом шоке и окислительном стрессе, и идентифицированы стресс-реактивные белки бактерии.

В работе был использован штамм *A. laidlawii* PG8, полученный из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (РАМН, Москва). Клетки микоплазм выращивали при 37°C в жидкой питательной среде Эдварда с модификациями [2]. Для сравнительных исследований протеомов *A. laidlawii* PG8 до и после воздействия стрессоров клетки микоплазмы, культивируемые на полноценной питательной среде Эдварда при 37°C, подвергали на средней экспоненциальной фазе роста холодовому шоку (понижение температуры до 8°C в течение 2 ч) или окислительному стрессу (инкубирование микоплазм в питательной среде с добавлением H₂O₂ до конечной концентрации 1 мМ в течение 20 мин). Клетки осаждали центрифугированием 12000 об/мин при 4°C в течение 20 мин; осадок дважды промывали в среде, содержащей 150 мМ NaCl, 50 мМ трис, 2 мМ MgCl₂, pH 7.4, и хранили при –80°C.

Белки разделяли с помощью 2ДЕ по [5], окрашивали серебром [6], а также флуоресцентными красителями CyDye-DIGE Cy3 и CyDye-DIGE Cy5 (“Amersham”), позволяющими сравнительно

Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра
Российской Академии наук
Научно-исследовательский институт
физико-химической медицины, Москва