

РИБОНУКЛЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИКОПЛАЗМ

© 2014 г. О. Н. Ильинская^{*,1}, Ю. В. Сокурченко^{*}, В. В. Ульянова^{*},
В. И. Вершинина^{*}, П. В. Зеленихин^{*}, А. И. Колпаков^{*},
Е. С. Медведева^{**}, Н. Б. Баранова^{**}, М. Н. Давыдова^{**},
А. А. Музыкантов^{**}, О. А. Чернова^{**}, В. М. Чернов^{**}

^{*} Казанский (Приволжский) федеральный университет

^{**} Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН

Поступила в редакцию 19.08.2013 г.

Не обладая способностью к синтезу нуклеотидов *de novo*, микоплазмы должны секретировать нуклеодеполимеразы для пополнения пула предшественников нуклеиновых кислот. Нуклеазная активность микоплазм является важным фактором их патогенности. У бактериальных рибонуклеаз (РНКаз) обнаружен широкий спектр биологической активности, включая проовирусную и противоопухолевую, что вызывает значительный интерес и к РНКазам микоплазменного происхождения. В работе охарактеризована способность микоплазм *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma hominis* к синтезу и секреции РНКаз. Установлено, что эти микроорганизмы в стационарной фазе роста синтезируют Mg²⁺-зависимые РНКазы, максимальная активность которых зафиксирована вне клеток. Впервые определена локализация РНКаз *A. laidlawii*: практически 90% РНКазной активности данного микроорганизма ассоциировано с мембранными везикулами. Методами биоинформационного анализа установлена гомология нуклеотидных последовательностей 14 генов *Bacillus subtilis*, продукты которых обладают РНКазной активностью, с генами исследуемых микоплазм, также выявлено сходство аминокислотных последовательностей 4-х рибонуклеолитических белков *A. laidlawii* с РНКазой Bsn.

Ключевые слова: микоплазмы, *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma hominis*, рибонуклеазная активность, локализация, везикулы.

DOI: 10.7868/S0026365614030070

Интерес к микоплазмам (класс *Mollicutes*) обусловливается уникальностью биологии мельчайших прокариот и целым рядом практических задач. Большинство микоплазм – паразиты человека, животных и растений, некоторые – возбудители социально-значимых заболеваний, контаминанты клеточных культур и вакцинных препаратов [1]. Контроль микоплазменных инфекций и контаминаций представляет проблему, решение которой связывают с исследованиями основ адаптации микоплазм к условиям среды, определяющим их широкую распространенность в природе и проявление патогенности. Успешная реализация геномных проектов в отношении ряда микоплазм определила возможность использования постгеномных технологий для проведения соответствующих исследований. Уникальными по адаптивности видами микоплазм являются известные контаминанты клеточных культур *Acholeplasma laidlawii* (возбудитель фитомикоплазмозов) и *Mycoplasma hominis* (возбудитель респираторных и урогенитальных заболеваний человека) [2, 3]. В результате транскриптомно-протеомного анализа и наноскопии были идентифицированы стресс-реактивные белки этих микроорганизмов [4, 5] и показано, что адаптация и вирулентность микоплазм в значительной мере связаны с секрецией эстраклеточных мембранных везикул [6, 7].

Важным фактором патогенности микоплазм является нуклеазная активность. В отличие от других зубактерий, микоплазмы не способны к синтезу предшественников нуклеиновых кислот *de novo*. Наличие нуклеазной активности определяет возможность получения необходимых клеткам микоплазм предшественников для синтеза нуклеиновых кислот [2, 3]. Рибонуклеолитическая (РНКазная) активность может в значительной мере обуславливать генотоксические свойства этих бактерий [8]. Ранее было показано, что нуклеазная активность микоплазм в основном связана с мембраной [9]. Между тем данные протеомного профилирования свидетельствуют, что эстраклеточные мембранные везикулы ряда бак-

раторных и урогенитальных заболеваний человека) [2, 3]. В результате транскриптомно-протеомного анализа и наноскопии были идентифицированы стресс-реактивные белки этих микроорганизмов [4, 5] и показано, что адаптация и вирулентность микоплазм в значительной мере связаны с секрецией эстраклеточных мембранных везикул [6, 7].

Важным фактором патогенности микоплазм является нуклеазная активность. В отличие от других зубактерий, микоплазмы не способны к синтезу предшественников нуклеиновых кислот *de novo*. Наличие нуклеазной активности определяет возможность получения необходимых клеткам микоплазм предшественников для синтеза нуклеиновых кислот [2, 3]. Рибонуклеолитическая (РНКазная) активность может в значительной мере обуславливать генотоксические свойства этих бактерий [8]. Ранее было показано, что нуклеазная активность микоплазм в основном связана с мембраной [9]. Между тем данные протеомного профилирования свидетельствуют, что эстраклеточные мембранные везикулы ряда бак-

¹ Автор для корреспонденции (e-mail: ilinskaya_kfu@mail.ru).

терий опосредуют трафик РНКаз [10, 11]. В связи с этим анализ везикул микоплазм на наличие РНКазной активности представляет особый интерес.

Малые размеры генома микоплазм ассоциированы с его высокой информационной емкостью [12, 13]. Несмотря на особенности структуры генов микоплазм, установлена значимая гомология нуклеотидных последовательностей ДНК, кодирующих белки, в частности, РНКаз, участвующих в метаболизме этих микроорганизмов и филогенетически близких им бактерий – бацилл [14, 15]. Так, ген *rnhC*, один из трех генов *B. subtilis*, кодирующих внутриклеточные неспецифические эндорибонуклеазы, расщепляющие 3'-О-Р связь РНК в дуплексе ДНК/РНК, кодирует РНКазу НПП (33.9 kDa), и имеет гомологию с генами *M. genitalium* (GenBank, accession no. MG199) и *M. pneumoniae* (GenBank, accession no. C09_orf143b) [16]. Что касается внеклеточных РНКаз, то секретируемую РНКазу Bsn (241 аминокислот, 27кДа) в *B. subtilis* кодирует ген *bsn* [17], гомологичный фермент (биназа-II, 292 аминокислоты, кодирующий ген *birB*) также продуцирует *B. pumilus* [18]. Эти факты обуславливают целесообразность поиска в геномах микоплазм генов секретируемых РНКаз, гомологичных бациллярным.

РНКазы применяются в генной инженерии, молекулярной биологии и биотехнологии для удаления РНК из биологического материала, структурно-функциональных исследований нуклеиновых кислот и их комплексов с белками, разработке векторов для позитивной селекции рекомбинантов, получения стерильных трансгенных растений. Перспективный прикладной аспект использования микробных РНКаз связан с их антивирусным и противоопухолевым потенциалом [19, 20]. Изучение РНКаз микоплазм поможет расширить понимание о природе патогенности этих бактерий и выявить новые аспекты значимости РНКаз для физиологических процессов.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явились поиск и характеристика РНКазной активности *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma hominis*, выявление оптимальных параметров ее проявления и установление основной локализации в клетке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы. В качестве объектов исследования были использованы штаммы бактерий *Acholeplasma laidlawii* PG8 и *Mycoplasma hominis* PG37, полученные из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи.

Культивирование. *A. laidlawii* PG8 и *M. hominis* PG31 культивировали на среде Эдварда с незначительными модификациями [21] при 37°C. Кон-

троль роста культур осуществляли визуально по изменению окраски фенолового красного в среде, параллельно определяли количество колониеобразующих единиц в 1 мл среды (КОЕ/мл). Продолжительность культивирования для измерения РНКазной активности клеток и выделения мембранной фракции составляла 30 ч (стационарная фаза роста, 1.2×10^9 КОЕ/мл).

Изоляция мембран клеток. Клетки осаждали с помощью центрифугирования (10000 g, 10 мин), дважды отмывали в буфере (0.05 М *trис*-HCl, pH 7.4, 0.15 М NaCl, 0.01 М 2-меркаптоэтанол) и лизировали в деионизованной воде (37°C 30 мин). Не лизировавшиеся клетки осаждали с помощью центрифугирования (10000 g, 10 мин), а супернатант центрифугировали при 37000 g в течение 40 мин, чтобы осадить мембранную фракцию. Мембраны дважды отмывали тем же буфером без 2-меркаптоэтанола, ресуспендировали в 1000 мкл буфера и хранили при -20°C.

Выделение мембранных везикул *A. laidlawii* PG8. Мембранные везикулы выделяли из 200 мл культуры как описано ранее [6]. Клетки осаждали с помощью центрифугирования (15000 g, 40 мин), а супернатант концентрировали с помощью концентратора Vivacell 100 ("Sartorius Stedim Biotech GmbH", Германия). Концентрат фильтровали через стерильный ацетат-целлюлозный фильтр ("Sartorius Minisart", Франция) с размером пор 100 нм. Далее фильтрат концентрировали с помощью концентратора Amicon Ultra-15 100K ("Millipore", США) и шестикратно промывали буфером (50 mM *trис*-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl). Суспензию хранили при 8°C.

Получение периферийных белков. Для получения различных фракций периферийных белков клетки *A. laidlawii* PG8 и *M. hominis* PG37 последовательно ресуспендировали в десятикратных объемах растворов различной ионной силы и центрифугировали 20 мин при 4400 g (4°C). Использовали три раствора: № 1 (50 mM *trис*-HCl, 0.15 М NaCl и 2 mM MgCl₂), № 2 (50 mM *trис*-HCl, 0.075 М NaCl и 1 mM MgCl₂) и № 3 (50 mM *trис*-HCl, 0.0375 М NaCl и 0.5 mM MgCl₂), при этом ресуспендирование в растворе № 1 проводили два раза. Таким образом, были получены четыре фракции периферийных белков: Ia, Ib, II и III, для обеих микоплазм.

Определение активности РНКаз. Количественное определение рибонуклеазной активности проводили модифицированным методом Анфинсена по кислоторастворимым продуктам гидролиза РНК [22]. Активность РНКаз определяли в супернатанте культуральной жидкости, чистой среде, мембранной фракции, 4-х фракциях периферийных белков, фракции цитоплазматических белков после лизиса (только для *A. laidlawii* PG8), фракции мембранных везикул (только для *A. laid-*

Таблица 1. Гомологичные гены *B. subtilis*, *A. laidlawii* и *M. hominis*, продукты которых обладают РНКазной активностью

Название кодируемого белка*	Локус гена в геноме		
	<i>B. subtilis</i>	<i>A. laidlawii</i>	<i>M. hominis</i>
Рибонуклеаза III	BSU15930	ACL_0228	MHO_4690
Рибонуклеаза J1	BSU14530	ACL_0309	MHO_3380
Рибонуклеаза НII	BSU16060	ACL_0338	MHO_3300
АТФ-зависимая РНК хеликаза	BSU04580	ACL_0432	—
АТФ-зависимая РНК хеликаза	BSU04580	ACL_0481	—
Рибонуклеаза J1	BSU14530	ACL_0832	MHO_3690
Полинуклеотидфосфорилаза (PNPase)	BSU16690	ACL_0808	—
Рибонуклеаза M5	BSU00410	ACL_0015	MHO_2160
Рибонуклеаза III	BSU15930	ACL_0637	MHO_0830
Рибонуклеаза P	BSU41050	ACL_1432	MHO_0020
Рибонуклеаза для созревания 23S РНК	BSU00950	ACL_0144	—
Гипотетическая экзорибонуклеаза	BSU31470	ACL_0307	—
Рибонуклеаза R	BSU33610	ACL_0405	MHO_1900
Рибонуклеаза НIII	BSU28620	ACL_0815	MHO_3300

* Названия даны по аннотации генома *B. subtilis* и могут отличаться у микоплазм.

lawii PG8). Белок определяли по Брэдфорду [23]. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающее увеличение оптической плотности в опытных пробах по сравнению с контрольными на 1 единицу за 1 ч инкубации, в пересчете на 1 мл ферментного раствора. Удельную активность рассчитывали на 1 мг белка.

Биоинформационный анализ. Поиск гомологичных генов, кодирующих РНКазы *A. laidlawii*, *M. hominis* и *B. subtilis*, осуществляли при полногеномном сравнении этих микроорганизмов с помощью баз данных CMR (<http://cmr.jcvi.org>, подпрограмма “Protein Scatter Plot”). Из полученных данных выбирали последовательности, имеющиеся в геноме *B. subtilis* и хотя бы одной микоплазмы.

Поиск последовательностей генов нуклеолитических белков *A. laidlawii* PG8, гомологичных внеклеточным РНКазам рода *Bacillus* — РНКазы *B. pumilus* (биназы) и РНКазы Bsn *B. subtilis* — проводили в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>), основываясь на филогенетической близости *A. laidlawii* к грамположительным бактериям с низким содержанием Г + Ц в ДНК (31%). Поиск у *A. laidlawii* PG-8A аминокислотных последовательностей, сходных с РНКазой Bsn, проводили с использованием алгоритма “DELTA-BLAST” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве заданной последовательности использовали зрелую форму рибонуклеазы *B. subtilis* 168 (идентификатор CAB15244.1), состоящую из 262 аминокислотных остатков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гомология нуклеотидных последовательностей РНКаз *A. laidlawii*, *M. hominis* и *B. subtilis*. В геномах трех видов микроорганизмов было выявлено 14 гомологичных генов, кодирующих белки с РНКазной активностью (табл. 1). Для 5 генов, присутствующих в геномах *A. laidlawii* и *B. subtilis*, соответствующего гомолога у *M. hominis* обнаружено не было. У всех трех видов микроорганизмов в геномах присутствуют гены РНКаз, которые или не имеют гомологичного гена в двух других геномах, или гомолог кодирует белок с иной функцией (данные не представлены). Сравнительно недавно появились данные о пространственной организации протеома микоплазм и представленности белков в динамичных белковых ассоциатах [13]. Показана возможность одного и того же белка изменять свою локализацию в клетке (мембрана, цитоплазма, внеклеточное пространство) в зависимости от взаимодействующих с ним белков. Наряду с классическими путями секреции, когда в аминокислотной последовательности белка имеется сигнальный пептид или характерный мотив, у бактерий представлен секреторный путь, опосредованный экстраклеточными мембранными везикулами, который активно исследуется в последние годы. Сигнальные последовательности у белков, секреторируемых с помощью везикул, не выявлены [24]. Данные протеомного профилирования свидетельствуют, что везикулы ряда бактерий опосредуют трафик РНКаз [10, 11]. РНКазная активность может в значительной мере обуслови-

Таблица 2. Результаты поиска аминокислотных последовательностей *A. laidlawii* PG-8A, сходных с РНКазой Bsp

№	Идентификатор в базе данных белков NCBI	Описание	Оценка вероятности случайного совпадения (E-value)	Перекрытие	Идентичность	Сходство	Промежутки
1	YP_001620119.1	Предполагаемая внеклеточная эндонуклеаза, заякоренная на поверхности клетки	4×10^{-50}	84%	76/228 (33%)	107/228 (46%)	16/228 (7%)
2	YP_001620162.1	Внеклеточная эндонуклеаза, содержащая домен эндонуклеазы I	3×10^{-47}	85%	88/245 (36%)	120/245 (48%)	39/245 (15%)
3	YP_001620156.1	Предполагаемая внеклеточная эндонуклеаза, заякоренная на поверхности клетки	1×10^{-38}	57%	55/151 (369%)	78/151 (51%)	26/151 (17%)
4	YP_001620157.1	Гипотетический белок, включающий домен внеклеточной эндонуклеазы	3×10^{-37}	83%	69/220 (31%)	95/220 (43%)	42/220 (19%)

вать генотоксические свойства микоплазм и секретируемых клетками этих бактерий везикул [8]. В этой связи анализ распределения РНКазной активности в клеточных фракциях, в том числе в везикулах микоплазм, представляет особый интерес.

Гомология аминокислотных последовательностей *A. laidlawii* PG8 и бациллярных РНКаз. Для поиска микоплазменных секретируемых РНКаз мы в качестве гомологов выбрали две бациллярные РНКазы. При сравнении аминокислотных последовательностей *A. laidlawii* с биназой нами не обнаружено ни одного статистически значимо-

го совпадения. В случае РНКазы Bsp выявлено десять совпадений, четыре из которых были статистически значимыми (№ 1–4), поскольку вероятность случайного совпадения (E-value) для них не превышает 10^{-3} (табл. 2). Идентичность выявленных нуклеаз РНКазе Bsp составила 33–41%, сходство с учетом консервативных замен – 44–55%. Выравнивание четырех обнаруженных последовательностей и РНКазы Bsp, содержащей консервативный домен суперсемейства эндонуклеазы I, показало, что сходные участки принадлежат этому консервативному домену (рис. 1). Полученные

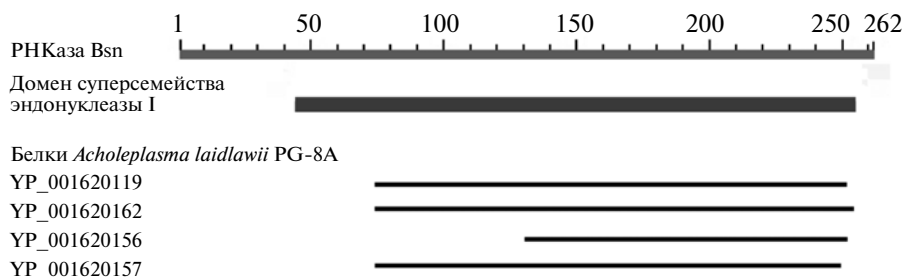


Рис. 1. Области перекрытия обнаруженных у *Acholeplasma laidlawii* PG-8A аминокислотных последовательностей с заданной последовательностью РНКазы Bsp, включающей консервативный домен суперсемейства эндонуклеазы I.

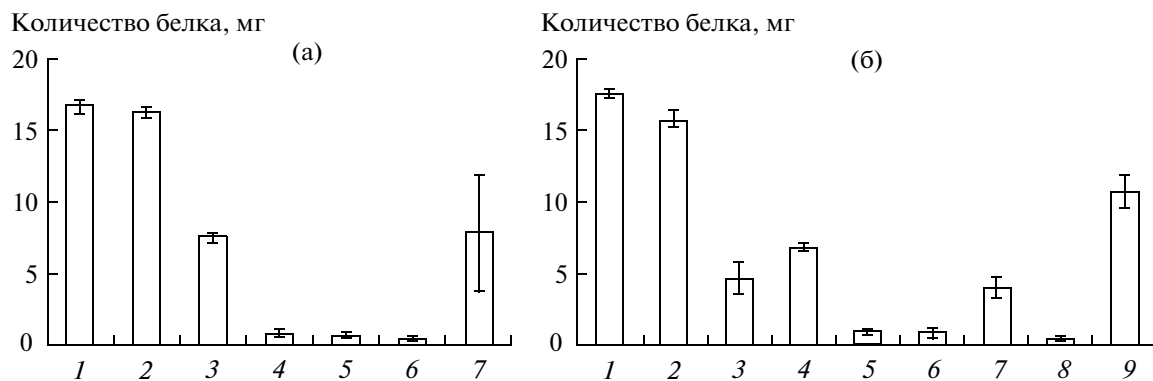


Рис. 2. Количественное содержание белка в среде культивирования, культуральной жидкости и клеточных фракциях *M. hominis* PG37 (а) и *A. laidlawii* PG8 (б): 1 – культуральная жидкость, 2 – среда, 3 – периферические белки Ia, 4 – периферические белки Ib, 5 – периферические белки II, 6 – периферические белки III, 7 – мембраны, 8 – цитозоль, 9 – везикулы.

данные свидетельствуют о принадлежности идентифицированных последовательностей к внеклеточным эндонуклеазам, что обосновало дальнейшее экспериментальное определение РНКазной активности в культуральной жидкости и клеточных фракциях микоплазм.

Активность РНКаз во внеклеточной среде и клеточных фракциях микоплазм. Нами получено 4 фракции периферических белков, последовательно экстрагированных растворами разной ионной силы, фракции мембран, а также цитозоля и везикул для *A. laidlawii* PG8. Отметим, что в связи с особенностью выращивания микоплазм среда культивирования, и, соответственно, культуральная жидкость, содержат значительное количество белков (рис. 2), среди которых есть и обладающие РНКазной активностью (табл. 3). Обнаруженная нами гомология последовательности генов *A. laidlawii* с РНКазой Bsn, неспецифически гидролизующей РНК до олигонуклеозидов с 5'-терминальным фосфатом и являющейся Mg^{2+} -активируемым ферментом [17], обусловила проверку возможности активации выявленной рибонуклеолитической активности ионами магния. Оказалось, что РНКазы питательных сред имеют наибольшую активность при pH 5 в отсутствие ионов Mg^{2+} , в отличие от РНКаз культуральной жидкости и клеточных фракций, наиболее активных при слабощелочном pH в присутствии магния. Вероятно, РНКазы питательных сред, внесенные с сывороткой крови лошади и дрожжевым экстрактом, принципиально отличаются от РНКаз микоплазм. Исключение составила активность мембранных РНКаз *A. laidlawii* PG8, активируемая Mg^{2+} при pH 5 (табл. 3). Высокий уровень рибонуклеолитической активности обнаружен в культуральной жидкости обеих микоплазм, причем у *A. laidlawii* PG8 он практически вдвое выше, чем у *M. hominis* PG37. В связи с этим мы получили также цитозольную и везикулярную фракции

клеток *A. laidlawii* PG8 и установили, что максимальной активностью РНКаз обладали секретрируемые везикулы данной бактерии (табл. 3).

Распределение РНКазной активности микоплазм по фракциям. Распределение РНКазной активности по фракциям показало, что при pH 7.4 рибонуклеолитическая активность для обеих микоплазм преимущественно обнаруживается вне клетки: уровень активности секретрируемых РНКаз составляет 95% от общей активности этих ферментов в клетках и культуральной жидкости для *A. laidlawii* PG8 и 86% для *M. hominis* PG37 (табл. 4). Содержание РНКаз в мембранной фракции и во фракции суммарных периферических белков невелико. У *M. hominis* PG37 оно составляет, соответственно, величины около 3 и 19%, что превышает аналогичные значения для *A. laidlawii* PG8, вероятно, вследствие того, что везикулы *M. hominis* PG37 нами не выделялись, и находящиеся в них РНКазы были распределены по фракциям культуральной жидкости и периферических белков. При щелочном pH 8.5, как и при pH 7.4, для РНКаз *M. hominis* PG37 сохраняется сходное распределение активности. У *A. laidlawii* PG8, где нам удалось изолировать фракцию мембранных везикул, преимущественная доля рибонуклеолитической активности (89%) при щелочном pH обнаружена именно в везикулах (табл. 4).

Сведения о локализации нуклеолитической активности микоплазм в мембранах клеток относятся к 90-м годам прошлого века [9]. Последние 20 лет интенсивно развиваются исследования бактериальных мембранных везикул, которые являются субклеточными органеллами и могут выполнять различные функции, включая транспорт нуклеиновых кислот и детерминант вирулентности, защиту клеток от действия антимикробных факторов, элиминацию клеточных токсинов [25]. Везикулы обнаружены и охарактеризованы у грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* [26],

Таблица 3. Активность РНКаз во внеклеточной среде и клеточных фракциях микоплазм (ед/мг белка в час)

Фракции	рН	<i>A. laidlawii</i> PG8		<i>M. hominis</i> PG37	
		без MgCl ₂	2 мМ MgCl ₂	без MgCl ₂	2 мМ MgCl ₂
Среда	5.0	10.51	2.27	1.87	0.00
	7.4	0.59	4.73	0.40	0.00
	8.5	0.85	2.44	0.00	2.30
Культуральная жидкость	5.0	1.80	1.19	3.17	5.57
	7.4	0.00	22.00	2.48	10.35
	8.5	3.01	4.74	4.53	4.30
Периферические белки Ia	5.0	0.18	0.17	0.26	0.83
	7.4	0.11	0.11	0.23	1.24
	8.5	0.22	0.13	0.23	0.90
Периферические белки Ib	5.0	0.26	0.22	0.04	0.03
	7.4	0.71	0.21	0.00	0.03
	8.5	0.32	0.23	0.02	0.04
Периферические белки II	5.0	0.02	0.04	0.03	0.02
	7.4	0.07	0.11	0.01	0.03
	8.5	0.04	0.08	0.04	0.02
Периферические белки III	5.0	0.05	0.07	0.02	0.02
	7.4	0.07	0.06	0.02	0.03
	8.5	0.05	0.09	0.02	0.05
Мембраны	5.0	0.32	1.52	0.15	0.03
	7.4	0.10	0.07	0.22	0.35
	8.5	0.03	0.02	0.67	0.00
Цитозоль	5.0	0.13	0.12	Не определяли	
	7.4	0.03	0.21		
	8.5	0.04	0.06		
Везикулы	5.0	0.05	0.44	Не определяли	
	7.4	0.12	0.33		
	8.5	2.62	43.28		

Представлены данные трех независимых экспериментов. Среднеквадратичное отклонение не превышает 12%.

Pseudomonas aeruginosa [27], грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* [28] и др. Последние работы выявили наличие таких везикул у микоплазмы *A. laidlawii* PG8 [6, 7].

Учитывая цитотоксический потенциал многих бактериальных РНКаз [20], можно предположить, что последствия инфицирования клеток микоплазмами различаются, по крайней мере отчасти, уровнем секреции и активностью РНКаз этих бактерий. Так, *M. fermentans* и *M. penetrans* эффективно поддерживают рост (IL)-3-зависимых лимфобластов костного мозга мышей, *M. hominis* и *M. salivarium*, напротив, индуцируют апоптоз этих клеток, а *M. genitalium* не обладает апоптоз-модулирующим эффектом [29]. В этом контексте обнаруженная нами высокая РНКазная ак-

тивность *M. hominis* PG37 и ее внеклеточная локализация (10.35 ед/мг белка в час, 86% от общей активности клеток и культуральной жидкости) подтверждают возможность апоптогенного действия данных ферментов. В нашей работе впервые установлено, что в стационарной фазе роста микоплазм основная часть активности магний-зависимых РНКаз этих бактерий проявляется при физиологическом значении рН и имеет внеклеточную локализацию. РНКазы *A. laidlawii* PG8, активные при щелочном рН, составляют 89% всех клеточных и внеклеточных РНКаз данного микроорганизма и локализованы в мембранных везикулах. Дальнейшая детальная характеристика функциональных белков везикул микоплазм определенно внесет вклад в понимание механиз-

Таблица 4. Процентное содержание рибонуклеолитической активности (активируемой Mg^{2+}) в культуральной жидкости и клеточных фракциях микоплазм. За 100% принята суммарная активность культуральной жидкости (за вычетом активности среды) и всех клеточных фракций при определенном рН

Фракция	рН	<i>A. laidlawii</i> PG8	<i>M. hominis</i> PG37
Культуральная жидкость	7.4	95.19	86.03
	8.5	9.74	81.12
Суммарные периферические белки	7.4	2.16	10.02
	8.5	1.08	18.88
Мембраны	7.4	0.30	2.91
	8.5	0.04	0.00
Цитозоль	7.4	0.92	1.04
	8.5	0.15	0.00
Везикулы	7.4	1.43	Не определяли
	8.5	88.99	Не определяли

Представлены данные трех независимых экспериментов. Среднеквадратичное отклонение не превышает 12%.

мов взаимодействия этих инфектогенов с различными клетками.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-04-01226а) и ГК ФЦП (соглашение № 8048).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Razin Sh., Hayflick L. Highlights of mycoplasma research – An historical perspective // *Biologicals*. 2010. V. 38. P. 183–190.
- Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика. СПб.: Наука, 2002. 319 с.
- Razin Sh., Herrmann R. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. New York: Kluwer, 2002. 572 p.
- Чернов В.М., Чернова О.А., Баранова Н.Б., Горшков О.В., Медведева Е.С., Шаймарданова Г.Ф. Адаптация микоплазм к стрессовым условиям: особенности изменений протеома у *Mycoplasma hominis* PG37 при голодании и пониженной температуре среды // *Мол. биология*. 2011. Т. 45. № 5. С. 914–923.
Chernov V.M., Chernova O.A., Baranova N.B., Gorshkov O.V., Medvedeva E.S., Shaymardanova G.F. Mycoplasma adaptation to stress conditions: Proteome shift in *Mycoplasma hominis* PG37 in response to starvation and low temperatures // *Mol. Biol.* 2011. V. 45. № 5. P. 843–851.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Medvedeva E.S., Mouzykantov A.A., Ponomareva A.A., Shaymardanova G.F., Gorshkov O.V., Trushin M.V. Unadapted and adapted to starvation *Acholeplasma laidlawii* cells induce different responses of *Oryza sativa*, as determined by proteome analysis // *J. Proteomics*. 2011. V. 74. № 12. P. 2920–2936.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Efimova I.R., Shaymardanova G.F., Medvedeva E.S., Trushin M.V. Extracellular vesicles derived from *Acholeplasma laidlawii* PG8 // *ScientificWorldJournal*. 2011. V. 11. P. 1120–1130.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Gorshkov O.V., Trushin M.V., Nesterova T.N., Ponomareva A.A. Extracellular membrane vesicles and phytopathogenicity of *Acholeplasma laidlawii* PG8 // *ScientificWorldJournal*. 2012:315474. doi: 10.1100/2012/315474.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Margulis A.B., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Medvedeva E.S., Kolpakov A.I., Ilinskaya O.N. 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.* 2009. V. 6. № 1. P. 104–106.
- Minion F.C., Goguen J.D. Identification and preliminary characterization of external membrane-bound nuclease activities in *Mycoplasma pulmonis* // *Infect. Immun.* 1986. V. 51. № 1. P. 352–354.
- Galka F., Wai S.N., Kusch H., Engelmann S., Hecker M., Schmeck B., Hippenstiel S., Uhlin B.E., Steinert M. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles // *Infect. Immun.* 2008. V. 76. № 5. P. 1825–1836.
- Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U., Manyam G., Morozov V.N., Zhou W., van Hoek M.L. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine // *J. Proteome Res.* 2011. V. 10. № 3. P. 954–967.
- Portnoy V., Schuster G. *Mycoplasma gallisepticum* as the first analyzed bacterium in which RNA is not polyadenylated // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. V. 283. P. 97–103.
- 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. Proteome organization in a genome-reduced bacterium // Science. 2009. V. 326. P. 1235–1240.
14. Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkl E., Li B.-C., Herrmann R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. № 22. P. 4420–4449.
 15. Razin S., Yagev D., Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62. № 4. P. 1094–1156.
 16. Itaya M., Omori A., Kanaya S., Crouch R.J., Tanaka T., Kondo K. Isolation of RNase H genes that are essential for growth of *Bacillus subtilis* 168 // J. Bacteriol. 1999. V. 181. № 7. P. 2118–2123.
 17. Nakamura A., Koide Y., Miyazaki H., Kitamura A., Masaki H., Beppu T., Uozumi T. Gene cloning and characterization of a novel extracellular ribonuclease of *Bacillus subtilis* // Eur. J. Biochem. 1992. V. 209. № 1. P. 121–127.
 18. Hahnen E., Znamenskaya L., Koczan D., Leshchinskaya I., Hobom G. A novel secreted ribonuclease from *Bacillus intermedius*: gene structure and regulatory control // Mol. Gen. Genet. 2000. V. 263. № 4. P. 571–580.
 19. Ulyanova V., Verzhinina V., Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates // FEBS J. 2011. V. 278. № 19. P. 3633–3643.
 20. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents // Bioessays. 2008. V. 30. № 8. P. 781–790.
 21. Trushin M.V., Chernov V.M., Gorshkov O.V., Baranova N.B., Chernova O.A. 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) // ScientificWorldJournal. 2010. V. 18. № 10. P. 894–900.
 22. Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Оптимизация метода определения активности РНКазы с использованием высокополимерной РНК // Клинич. лаб. диагностика. 1999. № 5. P. 14–16.
 23. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
 24. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles // Annu. Rev. Microbiol. 2010. V. 64. P. 163–184.
 25. Manning A.J., Kuehn M.J. Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 23. № 1–2. P. 131–141.
 26. Bogdanov M., Aboulwafa M., Saier M.H., Jr. Subcellular localization and logistics of integral membrane protein biogenesis in *Escherichia coli* // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 23. № 1–2. P. 24–34.
 27. Macdonald I.A., Kuehn M.J. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. 2013. V. 195. № 13. P. 2971–2981.
 28. Gurung M., Moon D.C., Choi C.W., Lee J.H., Bae Y.C., Kim J., Lee Y.C., Seol S.Y., Cho D.T., Kim S.I., Lee J.C. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death // PLoS One. 2011. V. 6. № 11. e27958.
 29. Zhang S., Lo S.C. Effect of mycoplasmas on apoptosis of 32D cells is species-dependent // Curr. Microbiol. 2007. V. 54. № 5. P. 388–395.

Ribonucleolytic Activity of Mycoplasmas

O. N. Il'inskaya^{a,1}, Yu. V. Sokurenko^a, V. V. Ul'yanova^a, V. I. Verzhinina^a, P. V. Zelenikhin^a, A. I. Kolpakov^a, E. S. Medvedeva^b, N. B. Baranova^b, M. N. Davydova^b, A. A. Muzykantov^b, O. A. Chernova^b, and V. M. Chernov^b

^a Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

^b Kazan Institute for Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

Received October 28, 2013

Abstract—Mycoplasmas are incapable of de novo synthesis of nucleotides and must therefore secrete nucleases in order to replenish the pool of nucleic acid precursors. The nucleolytic activity of mycoplasmas is an important factor in their pathogenicity. Bacterial ribonucleases (RNases) may produce a broad spectrum of biological effects, including antiviral and antitumor activity. Mycoplasma RNases are therefore of interest. In the present work, capacity of *Acholeplasma laidlawii* and *Mycoplasma hominis* for RNase synthesis and secretion was studied. During the stationary growth phase, these organisms were found to synthesize Mg²⁺-dependent RNases, with their highest activity detected outside the cells. Localization of *A. laidlawii* RNases was determined: almost 90% of the RNase activity was found to be associated with the membrane vesicles. Bioinformational analysis revealed homology between the nucleotide sequences of 14 *Bacillus subtilis* genes encoding the products with RNase activity and the genes of the mycoplasmas under study. Amino acid sequences of 4 *A. laidlawii* proteins with ribonuclease activity and the Bsn RNase was also established.

Keywords: mycoplasmas, *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma hominis*, ribonuclease activity, localization, vesicles.

¹ Corresponding author; e-mail: ilinskaya_kfu@mail.ru)