

**АННОТИРОВАННЫЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ**  
**О РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЕННЫХ**  
**НА ЭТАПЕ № 1**

«Исследование нового класса секретируемых бактериальных токсигенов - экстраклеточных мембранных везикул микоплазм для разработки средств контроля микоплазменных инфекций, контаминации клеточных культур и вакцинных препаратов»

*Соглашение от 20 июля 2012 г. № 8048.*

*Тема: «Исследование нового класса секретируемых бактериальных токсигенов - экстраклеточных мембранных везикул микоплазм для разработки средств контроля микоплазменных инфекций, контаминации клеточных культур и вакцинных препаратов»*

*Исполнитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук*

*Ключевые слова: микоплазма, мембранные везикулы, протеом, транскриптом, секреция, токсигенность*

**1. Цель проекта**

*1.2. Формулировка задачи / проблемы, на решение которой направлен реализованный проект.*

Характеристика экстраклеточных мембранных везикул микоплазм - нового класса секретируемых бактериальных токсигенов для определения диагностических маркеров инфектов и контроля микоплазменных инфекций, контаминаций клеточных культур и вакцинных препаратов, обеспечивающая достижение научных результатов мирового уровня, а также подготовку научно-педагогических кадров и высококвалифицированных специалистов, закрепления их в сфере науки для формирования и развития научно-исследовательских коллективов, специализирующихся в молекулярной биологии, биотехнологии, геномной инженерии, токсикологии микроорганизмов и клеточных технологиях.

*1.3. Формулировка цели реализованного проекта, места и роли результатов проекта в решении задачи / проблемы, сформулированной в п. 1.1*

Характеристика экстраклеточных мембранных везикул микоплазм, основанная на результатах комплексного исследования экстраклеточных мембранных везикул в разных условиях среды с использованием классических подходов и постгеномных технологий, обеспечивает возможность определения диагностических маркеров инфектов нового типа и целевых мишеней для контроля микоплазменных инфекций, контаминаций клеточных культур и вакцинных препаратов. Полученные результаты способствуют отвечающей

мировому уровню подготовке научно-педагогических кадров и высококвалифицированных специалистов (в том числе молодых), закреплению их в сфере науки для формирования и развития научно-исследовательского коллектива, специализирующегося в области молекулярной биологии, генной инженерии, токсикологии микроорганизмов, а также клеточных технологий, и достижению заданных индикаторов и показателей. Результаты НИР внедрены в образовательный процесс в Институте фундаментальной медицины и биологии КФУ при постановке новых задач учебного практикума, создании нового лекционного курса, модернизации лекционных курсов, входящих в блок дисциплин федерального и регионального уровней для бакалавров-биологов и магистров направления «микробиология и вирусология».

## 2. Основные результаты проекта

2.1. *Краткое описание основных полученных результатов (основные теоретические и экспериментальные результаты, фактические данные, обнаруженные взаимосвязи и закономерности, характеристикисозданной научной продукции).*

1. С помощью зондовой наноскопии, а также трансмиссивной микроскопии нами проведен анализ везикуляции, а также ультраструктурной организации экстраклеточных мембранных везикул, продуцируемых клетками социально-значимых микоплазм, инфицирующих человека, животных, растения и контаминирующих клеточные культуры и вакцинные препараты (*Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma hominis*), в оптимальных и стрессовых условиях. В результате наноскопического анализа нами было установлено, что везикулы, высвобождаемые клетками микоплазм в оптимальных и стрессовых условиях, - сферические окруженные двухслойной мембраной наноструктуры, для большинства которых характерна умеренная или пониженная электронная плотность; размеры везикул, продуцируемых клетками *A.laidlawii*, *M.gallisepticum* и *M.hominis*, существенно различаются: клетки *A.laidlawii* высвобождают во внешнюю среду везикулы диаметром 70-90 нм и 110-120 нм, *M.gallisepticum* S6 - 20 - 70 нм, а *M.hominis* – 50-150 нм. В стрессовых условиях количество везикул, продуцируемых клетками микоплазм, возрастает почти в 3 раза и появляются везикулярные агрегаты.

2. В результате проведения ПЦР-анализа экстраклеточных мембранных везикул микоплазм с использованием геноспецифичных зондов в качестве праймеров для направленной амплификации нуклеотидных последовательностей нами установлено, что в составе нановезикулярных структур бактерий, образующихся в разных условиях среды, присутствуют нуклеотидные последовательности ДНК, соответствующие генам *dnaK* (кодирует белок теплового шока DnaK), ACL\_0546 (кодирует регулятор транскрипции

PadR семейства), *dnaA* (кодирует белок инициации репликации хромосомы DnaA), *parE* и *parC* (кодируют субъединицы ДНК-топоизомеразы), *pdhA* и *pdhB* (кодируют  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы пируватдегидрогеназы E1), *pdhC* (кодирует дигидролипоамид-ацетилтрансферазу), 5'-область *fbpA* (кодирует фибронектин связывающий белок A), *trx* (кодирует тиоредоксин), *pnp* (кодирует полирибонуклеотид-нуклеотидилтрансферазу), *tufB* (кодирует фактор элонгации EF-Tu), *ackA* (кодирует ацетаткиназу), *rpoB* (кодирует  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы), ACL\_0309 (кодирует белок суперсемейства металло- $\beta$ -лактамаз) в случае *A.laidlawii*, и *himA/hup* (кодирует ДНК-связывающий белок HU) *acoA* (кодирует  $\alpha$ -субъединицу пируватдегидрогеназы E1) и *tufB* (кодирует фактор элонгации EF-Tu) в случае *M.gallisepticum*, а также РНК, соответствующие генам *dnaA* (кодирует белок инициации репликации хромосомы DnaA), ACL\_0546 (кодирует регулятор транскрипции PadR семейства), *fbpA* (кодирует фибронектин связывающий белок A), *pdhC* (кодирует дигидролипоамид-ацетилтрансферазу), *pnp* (кодирует полирибонуклеотид-нуклеотидилтрансферазу), *trx* (кодирует тиоредоксин), *pdhB* (кодирует  $\beta$ -субъединицу пируватдегидрогеназы E1), *tufB* (кодирует фактор элонгации EF-Tu), *ackA* (кодирует ацетаткиназу), *rpoB* (кодирует  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы), ACL\_0309 (кодирует белок суперсемейства металло- $\beta$ -лактамаз) в случае *A.laidlawii*.

3. В результате протеомного анализа нами установлено, что экстраклеточные везикулы микоплазм помимо мембранных белков могут содержать цитоплазматические белки, состав и количество которых в везикулярном пуле зависит от условий роста бактерии. В результате применения протеомного подхода, основанного на разделении полипептидов с помощью двумерного электрофореза, на электрофореграммах растворимых белков экстраклеточных мембранных везикул, продуцируемых в оптимальных и стрессовых условиях клетками *A.laidlawii* ("вездесущая" микоплазма, инфицирующая человека, животных, растения, являющаяся основным контаминантом клеточных культур и вакцинных препаратов), было обнаружено более 100 индивидуальных белковых пятен в каждом случае. В экстраклеточных везикулах, выделенных из культуры в стрессовых условиях, регистрируются 10 полипептидов, не обнаруживаемых в везикулах микоплазмы при росте в оптимальных условиях, но не выявляются 29 полипептидов, детектируемых в образцах культуры в случае неблагоприятных для роста бактерии условий.

4. С помощью масс-спектрометрии в составе мембранных везикул, продуцируемых клетками *A.laidlawii* в оптимальных и стрессовых условиях, нами идентифицированы кетозо-бисфосфат-альдолаза (Score 135; GI:162:448230, участвует в энергообразовании), Zn-зависимая протеаза (Score 158; GI:162447845, фактор вирулентности бактерий), белок теплового шока Hsp20 (Score 95;GI:162447286, участвует в стабилизации плазматической

мембраны и белков, фактор вирулентности) и енолаза (Score 190; GI162447667, участвует в энергообразовании, а также адгезии бактериальных клеток, фактор вирулентности бактерий). Существенные различия в количестве белков, экспортируемых посредством мембранных везикул *A.laidlawii*, были зарегистрированы для енолазы, Zn-зависимой протеазы и Hsp20. В стрессовых условиях количество енолазы, экспортируемой посредством мембранных везикул микоплазмы, возрастает почти в 2 раза, а Zn-зависимой протеазы и Hsp20 уменьшается почти в 5 раз.

5. На основании данных наноскопии, а также геномного и протеомного анализа экстраклеточных мембранных везикул определены диагностические маркеры нового класса инфектов – экстраклеточных мембранных везикул микоплазм и потенциальные мишени для контроля микоплазменных инфекций, контаминаций клеточных культур и вакцинных препаратов.

## *2.2. Описание новизны научных результатов.*

1. Впервые на основании анализа данных трансмиссивной и атомно-силовой микроскопии охарактеризована ультраструктура экстраклеточных мембранных везикул, продуцируемых в разных условиях среды клетками микоплазм, инфицирующих человека, животных, растения и контаминирующих клеточные культуры и вакцинные препараты (*A.laidlawii*, *M.gallisepticum* и *M.hominis*).

2. Впервые на основании ПЦР-анализа и сиквенса охарактеризованы нуклеотидные последовательности ДНК и РНК в составе экстраклеточных мембранных везикул, продуцируемых клетками микоплазм в разных условиях среды.

3. Впервые на основании протеомного анализа при использовании 2DIGE и MS/MS-TOF охарактеризован пул полипептидов в составе экстраклеточных мембранных везикул, продуцируемых в оптимальных и стрессовых условиях клетками “вездесущей микоплазмы”, инфицирующей человека, животных, растения, и являющейся основным контаминантом клеточных культур и вакцинных препаратов.

4. Впервые определены диагностические маркеры экстраклеточных мембранных везикул микоплазм - инфектов нового типа и потенциальные мишени для контроля микоплазменных инфекций, контаминаций клеточных культур и вакцинных препаратов.

## *2.3. Сопоставление с результатами аналогичных работ мирового уровня.*

Теоретический и практический уровень результатов проекта опережает аналоги зарубежных исследований и разработок как в России, так и за ее рубежами. Данные,

полученные в результате проведения 1-го этапа исследовательских работ по реализации инициативного проекта, являются пионерскими, они способствуют принципиально новому пониманию молекулярной и клеточной биологии микоплазм, инфицирующих человека, животных, растения, контаминирующих клеточные культуры и вакцинные препараты, и определяют возможность разработок эффективного контроля социально-значимых патогенов.

### **3. Назначение и область применения результатов проекта**

*3.1. Описание областей применения полученных результатов (области науки и техники; отрасли промышленности и социальной сферы, в которых могут или уже используются полученные результаты или созданная на их основе инновационная продукция).*

Результаты работы могут быть использованы в планировании новых поисковых проблемно-ориентированных исследований в области биомедицины, биотехнологии, ветеринарии и сельском хозяйстве: для выявления механизмов формирования системы паразит-хозяин, а также для создания эффективных принципиально новых подходов контроля микоплазменных инфекций человека, животных и растений, контаминаций клеточных культур и вакцинных препаратов.

Полученные результаты работы могут быть востребованы в медицинских учреждениях РФ, биотехнологических центрах, лабораториях научно-исследовательских институтов РАН, РАМН и РАСХН, работающих над решением проблемы противодействия микоплазменным инфекциям человека, животных, растений и контаминациям клеточных культур и вакцинных препаратов.

Результаты НИР внедрены в образовательный процесс в Институте фундаментальной медицины и биологии КФУ при постановке новых задач учебного практикума, создании нового лекционного курса, модернизации лекционных курсов, входящих в блок дисциплин федерального и регионального уровней для бакалавров-биологов и магистров направления «микробиология и вирусология». С использованием новых полученных экспериментальных данных будут защищены квалификационные работы студентов специальностей «микробиология» и «генетика» (курсовые и дипломные работы), а также диссертации.

### **4. Перспективы развития исследований**

1) Участие в ФЦП способствовало формированию новых исследовательских партнерств на 1 этапе выполнения Проекта в рамках Казанского (Приволжского) федерального университета с сотрудниками кафедр генетики и биохимии.

2) По аналогичной тематике коллектив принимает участие в проектах РФФИ:

- 11-04-01406а «Молекулярные основы адаптации микоплазм к биотическим и абиотическим стрессорам: белки мембранных везикул, секретируемых клетками *Acholeplasma laidlawii* PG8, и их гены». Срок выполнения: 2011-2013 гг.

- 12-04-31396 «Механизмы формирования устойчивости микоплазм к антибиотикам: секреция экстраклеточных мембранных везикул и эффлюкс ципрофлоксацина у *A. Laidlawii*». Срок выполнения: 2012-2013 гг.

**5. Опыт закрепления молодых исследователей – участников проекта (этапа проекта) в области науки, образования и высоких технологий**

Григорьева Татьяна Юрьевна, 25.05.1990 года рождения, зачислена в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук.

Федорова Ксения Павловна, 01.05.1998 года рождения, зачислена на должность инженера в научно-исследовательскую лабораторию биосинтеза и биоинженерии ферментов научно-исследовательского центра «Фундаментальной и прикладной биологии» биолого-почвенного факультета Казанского (Приволжского) федерального университета.

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра  
Российской академии наук

Гречкин А.Н.

Руководитель Проекта

Чернов В.М.