

УДК 579.8.05

## АДАПТАЦИЯ МИКОПЛАЗМ К АНТИМИКРОБНЫМ ПЕПТИДАМ: РАЗВИТИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К МЕЛИТТИНУ У *Acholeplasma laidlawii* СВЯЗАНО С ИЗМЕНЕНИЯМИ ГЕНОМНОГО, ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЕЙ И ВИРУЛЕНТНОСТИ

© 2020 г. В. М. Чернов<sup>1</sup>, Н. Б. Баранова<sup>1,2,\*</sup>, А. А. Музыкантов<sup>1</sup>,  
Е. С. Медведева<sup>1</sup>, М. А. Драмшини<sup>2</sup>, О. А. Чернова<sup>1,2</sup>

Представлено академиком РАН А. Н. Гречкиным

Поступило 13.07.2020 г.

После доработки 10.08.2020 г.

Принято к публикации 10.08.2020 г.

Впервые показано, что развитие резистентности к мелиттину у *Acholeplasma laidlawii* – широко распространенной в природе микоплазмы, являющейся основным контаминантом клеточных культур и вакцинных препаратов, связано с существенными изменениями геномного профиля, клеточного и везикулярного протеомов, а также вирулентности.

**Ключевые слова:** *Acholeplasma laidlawii*, антимикробные пептиды, мелиттин, резистентность, геномный профиль, клеточный и везикулярный протеомы, вирулом

**DOI:** 10.31857/S2686738920060062

*Acholeplasma laidlawii* – один из шести видов микоплазм (здесь – собирательное название представителей класса Mollicutes), являющихся основными контаминантами клеточных культур и вакцинных препаратов [1]. Подавление микоплазм и деконтаминация клеточных культур – серьезная проблема. Перспективы ее решения связаны с использованием антимикробных пептидов, прежде всего мелиттина, полученного из пчелиного яда [2]. Недавно появились данные о способности микоплазм развивать устойчивость к мелиттину [3, 4], но молекулярные основы резистентности бактерий к этому препарату не определены. Выяснение молекулярных основ адаптации к *Acholeplasma laidlawii* к мелиттину – цель нашего исследования.

В работе использовали штамм *Acholeplasma laidlawii* PG8B из коллекции микроорганизмов

ФГБУ “ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России НИИ эпидемиологии и микробиологии им Н.Ф. Гамалеи (Москва). Штамм *A. laidlawii* PG8R<sub>Mel</sub>, проявляющий повышенную устойчивость к мелиттину (МПК 21 мкг/мл), был получен в результате последовательного пересева культуры *A. laidlawii* PG8B (МПК 7 мкг/мл) в питательной среде Эдварда с возрастающей концентрацией антимикробного пептида. Культивирование микоплазмы, трансмиссивную электронную микроскопию (ТЭМ), а также выделение, очистку внеклеточных везикул (ВВ) штаммов и контроль чистоты препаратов (отсутствие клеток микоплазмы в образцах везикул) осуществляли как описано [5].

Секвенирование геномов штаммов *A. laidlawii* проводили на ДНК-секвенаторе GS Junior (“Roche Diagnostics”, Швейцария). Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали программу Sequencing Analysis 5.3.1 (“Applied Biosystems”, США), а также базу данных NCBI (National Center for Biotechnology Information). Для сборки ДНК последовательностей *de novo* применялся программный пакет Newbler (“Roche Diagnostics”, Швейцария), для выравнивания нуклеотидных последовательностей – Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>), для поиска и аннотации однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) – Samtools (<http://samtools.sourceforge.net/mpileup.shtml>) и

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский центр “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет”, Казань, Россия

\*e-mail: natalja-b@yandex.ru

Snpeff (<http://snpeff.sourceforge.net/SnpEff.html>) соответственно. Результаты полногеномного секвенирования *A. laidlawii* PG8R<sub>Mel</sub> были депонированы в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NELN00000000.2>). Протеомное профилирование клеток и внеклеточных везикул *A. laidlawii* проводили с помощью 2DE MALDI-TOF/TOF и 1D-LC-ESI-MS/MS, соответственно, как описано [5]. Для определения локализации белков использовали программу Psortb v3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/>). Идентифицированные белки классифицировали в соответствии с функциональными категориями EggNOG (<http://egg-nogdb.embl.de>). Для поиска белков, ассоциированных с бактериальной вирулентностью и устойчивостью к антимикробным препаратам, использовали базы данных CARD (<https://card.mcmaster.ca/home>), и VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>).

Мутагенность везикул и клеток *A. laidlawii* определяли как описано [6]. Статистическую обработку данных выполняли с помощью программного обеспечения MS Excel (Microsoft) и Origin 8.0. Сравнение средних значений проводили по критерию Стьюдента. При сравнении количества клеток в классах использовали критерий  $\chi^2$  ( $p$ ).

В геноме штамма PG8R<sub>Mel</sub> нами было обнаружено 208 SNPs (188 – в кодирующей части генома, 17 – в межгенных областях, 3 – в псевдогенах), из которых 142 – значимые мутации (рис. 1) (GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NELN00000000.2>). Мутации выявлены в генах, продукты которых могут быть вовлечены в защиту бактерий от антимикробных пептидов – белки мембран и эффлюксовой системы, протеазы, а также белки, вовлеченные в универсальный каскад ответных реакций микроорганизмов на стрессоры и эпигенетическую регуляцию. Однако существенная часть мутаций локализована в генах, кодирующих ключевые ферменты метаболизма и факторы бактериальной вирулентности. Кроме того, мутации обнаружены в генах, ассоциированных с адаптацией классических бактерий к антимикробным препаратам (мупиноцину, пенициллинам и фузидовой кислоте), в отношении которых микоплазмы индифферентны. Связаны ли они с *bacterial charity* [7], предстоит выяснить.

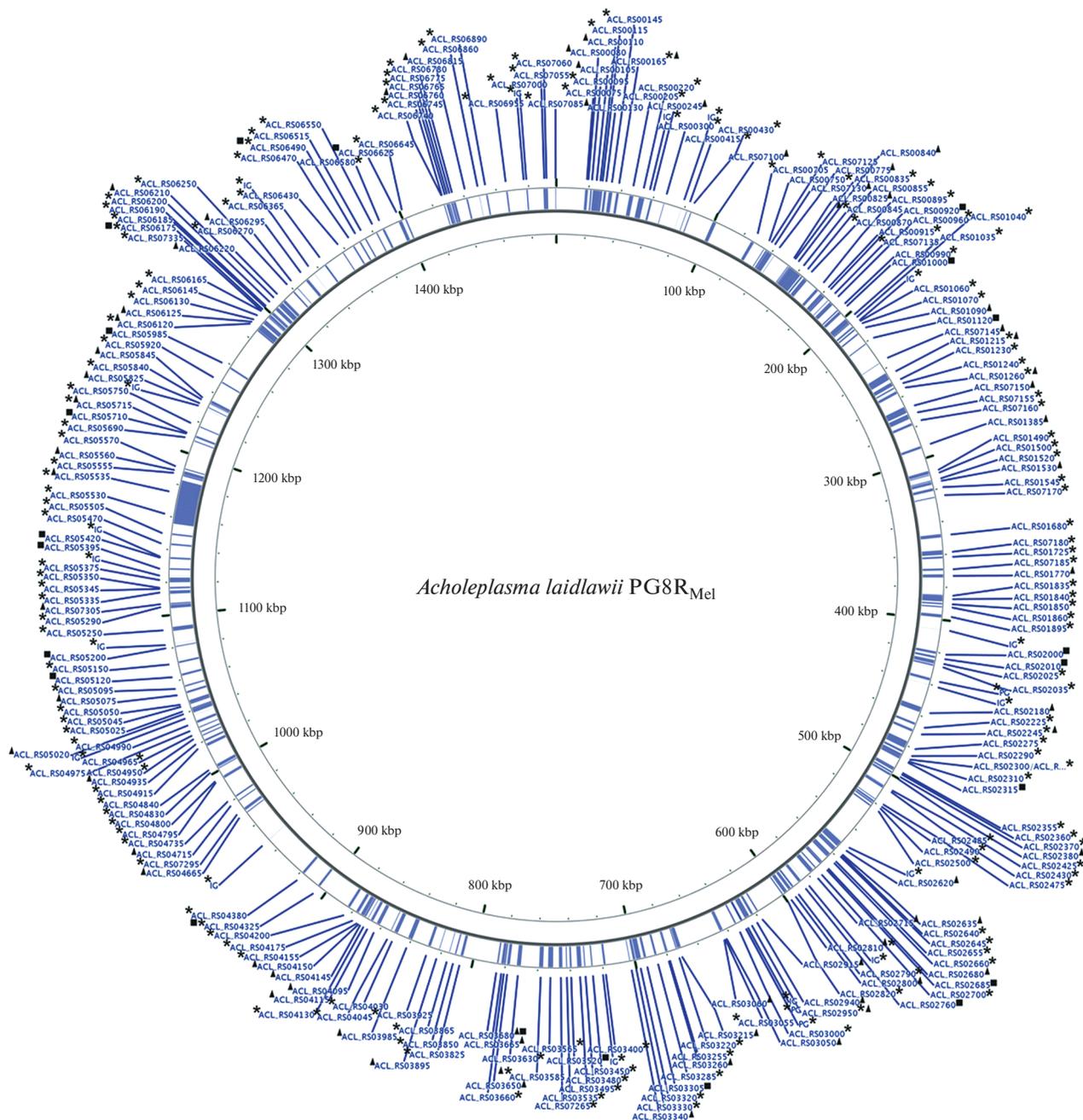
Протеомные профили клеток штаммов [8] тоже имеют существенные различия, которые связаны и с количественными, и с качественными изменениями полипептидного пула, а также появлением белковых изоформ у PG8R<sub>Mel</sub>. Образование последних связывают с универсальной защитной реакцией бактерий [9]. Значительное количество полипептидов, представленность которых у штаммов различается, вовлечено в стресс-реактивность, фундаментальные клеточные процессы

микроорганизмов и вирулентность. Некоторые дифференциально экспрессированные белки PG8R<sub>Mel</sub> кодируются генами, в которых выявлены мутации (рис. 1). Результаты протеомного анализа везикул также свидетельствуют о количественных и качественных различиях везикулярного пула белков у PG8R<sub>Mel</sub> и PG8B [8]. Существенную часть белков в везикулах PG8R<sub>Mel</sub> (55 из 64) составляют белки, которые не выявляются в везикулах штамма PG8B.

Некоторые из них ассоциированы с развитием устойчивости классических бактерий к антимикробным пептидам, входят в пул дифференциально экспрессированных и/или являются продуктами генов, в которых выявлены мутации (рис. 1). При этом в составе везикул PG8R<sub>Mel</sub> также обнаруживается бета субъединица ДНК-зависимой РНК полимеразы (ACL\_RS00840). Это единственный общий белок, который появляется в везикулах *A. laidlawii* при развитии резистентности к антимикробным препаратам разных классов – он обнаруживается и у штаммов, резистентных к тетрациклину и ципрофлоксацину, является у них продуктом мутантных версий гена и, в связи с этим, представляет интерес как потенциальная мишень для элиминации микоплазмы.

Значительная часть везикулярного протеома у PG8R<sub>Mel</sub>, как и у PG8B, составляют факторы вирулентности, но профиль их у штаммов существенно различается. Это (наряду с результатами анализа геномных профилей и протеомов клеток) позволяет предполагать, что адаптация *A. laidlawii* к мелиттину связана с изменением вирулентных свойств микоплазмы. Экспериментальные подтверждения этого предположения были получены нами при сравнительном анализе мутагенности штаммов. Инфицирование лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* клетками PG8R<sub>Mel</sub> приводит к тотальному преждевременному расхождению центромер в метафазе у 65% клеток. В случае штамма PG8B этот эффект не наблюдается. Выявленные нами особенности различий штаммов PG8R<sub>Mel</sub> и PG8B в отношении мутагенности, геномного профиля, а также протеомов клеток и везикул свидетельствуют, что адаптация *A. laidlawii* к мелиттину сопровождается существенными изменениями вирулома микоплазмы.

Таким образом, нами впервые получены данные о молекулярных основах развития устойчивости к мелиттину у *A. laidlawii*. Эти данные: 1) свидетельствуют о существенных изменениях геномного профиля, клеточного и везикулярного протеомов, а также вирулома бактерии при адаптации к антимикробному пептиду – мелиттину; 2) изменяют представления об арсенале средств самозащиты у простейших прокариот; 3) опреде-



**Рис. 1.** Локализация на геномной карте *Acholeplasma laidlawii* PG-8A генов, ассоциированных с развитием устойчивости микоплазмы к мелиттину. \* — гены, в первичной структуре которых обнаружены мутации относительно *A. laidlawii* PG8B; ■ — гены, кодирующие дифференциально экспрессируемые белки *A. laidlawii* PG8R<sub>Mel</sub>/*A. laidlawii* PG8B, ▲ — гены, кодирующие белки, выявленные во внеклеточных везикулах *A. laidlawii* PG8R<sub>Mel</sub>. Графическое изображение хромосомы получено с помощью GCView Server ([http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview\\_server/index.html](http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/index.html)).

ляют необходимость коррекции стратегии контроля микоплазм.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ФИЦ Казанского научного центра РАН, а также частично поддержана грантом РФФИ 18-04-00660. В исследовании использовали

оборудование Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis // G.F. Browning, C. Citti Eds L.: Caister Acad. Press, 2014. 350 p.

2. *Ravensdale J., Wong Z., O'Brien F., et al.* // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Article 1745.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01745>
3. *Park H.J., Kang K.M., Dybvig K., et al.* // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 3321–3326.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.08.016>
4. *Fehri L.F., Sirand-Pugnet P., Gourgues G. et al.* // *Antimicrob Agents Chemother.* 2005. V. 49. № 10. P. 4154–4165.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4154-4165.2005>
5. *Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., et al.* // *J. Proteomics.* 2014. V. 110. P. 117–128.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.020>
6. *Чернова О.А., Волкова Е.Н., Чернов В.М.* // *Генетика.* 1996. Т. 32. С. 810–814.
7. *Lee H.H., Molla M.N., Cantor C.R., et al.* // *Nature.* 2010. V. 467. P. 82–85.  
<https://doi.org/10.1038/nature09354>
8. *Medvedeva E.S., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., et al.* // *Data Brief.* 2019. V. 25:104169.  
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104169>
9. *Sriramulu D.D.* // *Proteomics Insights.* 2009. V. 2. P. 39–47.  
<https://doi.org/10.4137/PRI.S3760>

**ADAPTATION OF MYCOPLASMAS TO ANTIMICROBIAL PEPTIDES:  
DEVELOPMENT OF MELITTIN RESISTANCE IN *ACHOLEPLASMA  
LAIDLAWII* IS ASSOCIATED WITH A CHANGES IN GENOMIC  
AND PROTEOMIC PROFILES, AND ALSO VIRULENCE**

**V. M. Chernov<sup>a</sup>, N. B. Baranova<sup>a,b,#</sup>, A. A. Mouzykantov<sup>a</sup>, E. S. Medvedeva<sup>a</sup>,  
M. A. Dramchini<sup>b</sup>, and O. A. Chernova<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup> *Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Science Centre of RAS, Kazan, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: natalja-b@yandex.ru*

Presented by academician of the RAS A. N. Grechkin

For the first time it was shown that the development of resistance to melittin in *Acholeplasma laidlawii*, a widely spread in nature mycoplasma, which is the main contaminant of cell cultures and vaccines, is associated with significant changes in the genomic profile, cellular and vesicular proteomes, as well as virulence.

*Keywords:* *Acholeplasma laidlawii*, antimicrobial peptides, melittin, resistance, genomic profile, cellular and vesicular proteomes, virulome