

На правах рукописи

Сюткин Алексей Сергеевич

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЖГУТИКОВ

HALOARCUA MARISMORTUI

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2014 г.

Работа выполнена в группе надмолекулярных белковых структур Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка Российской академии наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Кандидат биологических наук

Пятибратов Михаил Геннадьевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Левицкий Дмитрий Иванович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук, лаборатория структурной биохимии белка, заведующий;

Долгих Дмитрий Александрович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук, лаборатория инженерии белка, заведующий.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук.

Защита состоится «_____» декабря 2014 г. в _____ часов на заседании совета Д 501.001.76 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайте www.bio.msu.ru.

Автореферат диссертации разослан «_____» октября 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук



И. А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одним из наиболее заметных открытий биологии XX века стало выделение Архей, наряду с Эукариотами и Бактериями, в качестве одного из трех доменов живой природы. В отдельную ветвь жизни они были отнесены Карлом Вузом в 1977 году на основании анализа 16S рРНК. Многие представители данной группы организмов являются экстремофилами, то есть занимают экологические ниши с экстремальными значениями температур (термофилы), pH (ацидофилы и алкалофилы), соленостей (галофилы) и т.д. К настоящему времени они так же обнаружены в почве, океанах и пищеварительной системе животных, в том числе и человека. Исследование их биологии показало, что они обладают как чертами схожими с бактериями и эукариотами, так и свойствами, характерными только для данной группы организмов. Одной из уникальных систем архей является аппарат жгутиковой подвижности, внеклеточная часть которого схожа с филаментом бактериального жгутика, и представляет собой протяженную спиральную нить. В ходе исследований, однако, было показано, что, несмотря на внешнее сходство, данные структуры принципиально отличаются по архитектуре, механизму сборки и происхождению, при этом архейные жгутики имеют ряд общих свойств с бактериальной системой пилей IV-го типа. В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что жгутики архей являются уникальной системой биологической подвижности, и в недавней работе было предложено называть жгутики Архей не жгутиками (flagella), а археллами (archaella) (Jarell and Albers, 2012). В связи с этим возникает вопрос, каким образом настолько различные органеллы как бактериальные и архейные жгутики формируют схожую надмолекулярную структуру?

Механизм спирализации жгутиков был детально изучен на энтеробактериях, спиральный филамент которых строится из субъединиц единственного белка – флагеллина. Данный белок может принимать две конформации, названные L- и R-конформациями. При этом каждый продольный ряд протофиламентов состоит из флагеллина, находящегося в одной из этих конформаций. Так как длины протофиламентов, состоящих из флагеллина в L- и R-конформациях, несколько отличаются, при их взаимодействии в составе филамента возникают силы скручивания, приводящие к спирализации нити жгутика.

В настоящее время жгутик архей, в сравнении с бактериальным аналогом, является малоизученной структурой как в плане строения, так и в плане функционирования. Одной из любопытных черт архей является гораздо большая, чем у бактерий, распространенность множественности генов структурного белка нити жгутика – флагеллина. Как уже было отмечено выше, жгутики архей и бактерий сильно отличаются друг от друга, вследствие

этого можно предположить, что множественность флагеллиновых генов архей связана с принципиально иным механизмом спирализации нити жгутика.

Степень разработанности темы. Для выяснения роли различных флагеллиновых генов у архей были проведены эксперименты по их инактивации на ограниченном круге организмов. Результаты экспериментов по инактивации флагеллиновых генов *Methanococcus maripaludis* показали необходимость продукта каждого гена для нормальной клеточной подвижности. В нашей группе на галофильном археоне *Halobacterium salinarum*, имеющем шесть генов флагеллинов, было показано, что для построения спирального и протяженного филамента жгутика данному организму достаточно двух флагеллинов - FlgA1 и FlgA2, гены которых располагаются в одном опероне. При этом инактивация каждого из двух генов приводила к тому, что *H. salinarum* продуцировал только прямые жгутики. Полученные результаты позволили выдвинуть предположение, что у данного организма два разных флагеллина могут быть аналогами двух конформационных состояний единственного флагеллина энтеробактерий. Так как множественность флагеллиновых генов широко распространена среди архей, было высказано предположение, что данный принцип формирования спирального филамента может быть универсален для архей. Однако с ростом числа архей с известными геномными последовательностями стало ясно, что даже представители галофилофильных архей могут сильно отличаться друг от друга по количеству, взаимному расположению и размеру флагеллиновых генов, что ставит вопрос об универсальности принципа, обнаруженного для *H. salinarum*.

Цели и задачи. Целью данной работы стала проверка универсальности открытого на *H. salinarum* принципа, согласно которому для построения спирального филамента жгутика галофильных архей необходимо как минимум два флагеллина. В качестве объекта исследования был выбран галофильный археон *Haloarcula marismortui*. Данный организм интересен по нескольким причинам: 1) в геноме присутствует два гена флагеллина, при этом каждый расположен на отдельном репликоне, что не характерно для архей; 2) гены флагеллинов примерно в два раза превышают по размеру гены флагеллинов большинства архей. Данные факты позволяют ожидать, что аппарат жгутиковой подвижности *H. marismortui* будет обладать необычными свойствами, изучение которых поможет лучше понять механизм спирализации жгутиков галофильных архей. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Показать наличие жгутиковой подвижности у клеток *H. marismortui*.
2. Выделить нити жгутиков *H. marismortui* и изучить их морфологию и состав.

3. Исследовать свойства флагеллинов *H. marismortui*.

4. Установить роль каждого из флагеллинов в формировании аппарата жгутиковой подвижности *H. marismortui*.

Научная новизна. В данной работе впервые было показано наличие подвижности *H. marismortui*. В ходе исследования мы обнаружили, что спиральный и функциональный жгутик данного организма может строиться только из одного типа субъединиц, и, таким образом, механизмы формирования спиральности жгутиков галофильных архей являются более разнообразными, чем считалось ранее. Наши исследования показали, что жгутики *H. marismortui* существенно толще жгутиков, ранее изученных архей, что, по-видимому, является результатом того, что они построены из более крупных флагеллинов, при этом сами флагеллины имеют необычный тип гликозилирования. Кроме того, мы впервые показали, что множественность флагеллиновых генов у архей может быть механизмом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выяснение принципов формирования надмолекулярных структур является одной из важнейших задач современной биологии. Понимание взаимосвязи между свойствами индивидуальных субъединиц и формируемой ими надмолекулярной структуры позволит целенаправленно изменять свойства природных ансамблей субъединиц. Прокариотические жгутики рассматриваются в качестве одного из наиболее перспективных объектов для создания на их основе искусственных нановолокон, обладающих заданными свойствами. Археи в этом плане представляют особый интерес, так как данные организмы обитают в экстремальных условиях, и, как следствие, формируемые ими структуры обладают повышенной устойчивостью к диссоциирующим воздействиям.

Положения, выносимые на защиту.

1. Клетки *H. marismortui* способны синтезировать два типа филаментов (жгутиков), отличающиеся белковым составом.

2. Спиральные филаменты жгутиков галофильных архей могут строиться только из одного типа субъединиц.

3. Субъединицы флагеллина FlaB в составе филаментов не идентичны по доступности к воздействию трипсина и зарядовым характеристикам.

4. Флагеллины *H. marismortui* являются гликопротеинами с необычным типом гликозилирования.

5. Множественность генов флагеллинов *H. marismortui* является механизмом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: на международных симпозиумах “Biological motility” (Пушино, Россия, 2008, 2010, 2012 и 2014); ежегодных институтских конференциях Института белка РАН (Пушино, Россия, 2007, 2012); на международных конференциях “Molecular biology of Archaea II” (Кембридж, Великобритания, 2010) и “Molecular biology of Archaea IV” (Париж, Франция, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них статей в рецензируемых научных изданиях – 3, материалов конференций – 9.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 122 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список использованной литературы». Список литературы включает 10 отечественных и 137 зарубежных наименований. Работа содержит 33 рисунка и 2 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Молекулярная организация жгутиков *H. marismortui*

Идентификация двух штаммов *H. marismortui*. Геном галофильного археона *H. marismortui* имеет полный набор генов необходимых для синтеза и функционирования аппарата жгутиковой подвижности, в том числе два гена, кодирующих флагеллины, которые располагаются на разных репликонах – хромосоме (*flaB*) и плазмиде (*flaA2*), что не характерно для других архей. Несмотря на это, первоначально данный организм был описан как не проявляющий явной подвижности.

Культура *H. marismortui*, полученная нами из Всероссийской коллекции микроорганизмов, была параллельно засеяна в среду HS (используемой нами для культивирования *H. salinarum*) и среду Tu, использовавшуюся при культивировании *H. marismortui*. Следует отметить, что по содержанию питательных компонентов среда Tu

является более богатой, чем HS. Клетки *H. marismortui* показывали неплохой рост в Tu-среде, но в среде HS росли очень медленно и дорастали максимум до $OD_{600}=0,5$ (в отличие от Tu-среды, где клетки, как правило, дорастали до $OD_{600}=2,5$). Культура, изначально росшая в HS-среде, была затем перенесена в среду Tu, где ее рост существенно ускорился. После этого из обеих культур мы провели выделение жгутиков с помощью методики, использовавшейся ранее для других галофильных архей. Электронно-микроскопические исследования подтвердили присутствие жгутиков в обоих препаратах (рисунок 1).

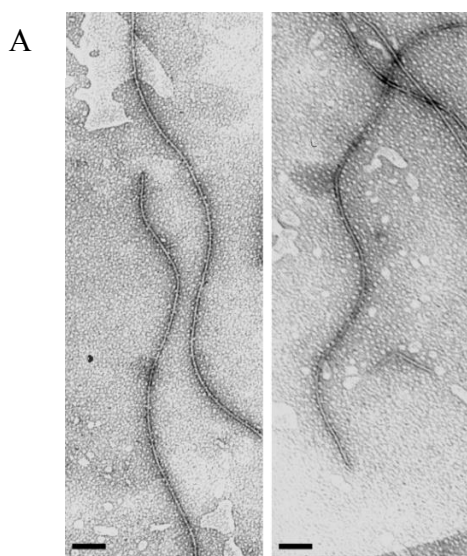


Рисунок 1. Электронно-микроскопические фотографии препаратов жгутиковых филаментов *H. marismortui*. А) филаменты, выделенные из культуры, росшей изначально на Tu-среде; Б) филаменты, выделенные из культуры, росшей изначально на HS-среде. Масштабная линейка – 200 нм. Результаты получены совместно с Безносовым С. Н.

По результатам ДСН-электрофореза в 15% ПААГ препараты содержали единственный белок с молекулярной массой около 70 кДа. В ходе дальнейших экспериментов с использованием гелей с меньшей плотностью акриламида выяснилось, что полученные препараты отличаются по электрофоретической подвижности (на рисунке 2 приводится электрофореграмма для 7% ДСН-ПААГ).

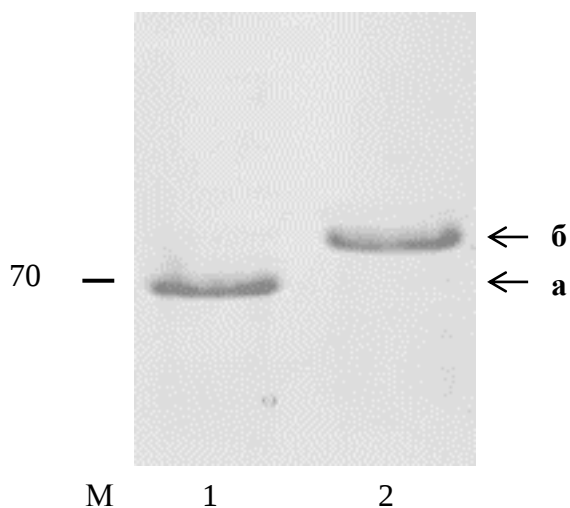


Рисунок 2. Электрофореграмма препаратов жгутиков *H. marismortui* в ДСН - ПААГ (7%). Трек: 1) препарат жгутиков, выделенный из культуры, росшей изначально на Tu-среде; 2) препарат жгутиков, выделенный из культуры, росшей изначально на среде HS. М – белковый маркер (кДа).

Масс-спектрометрия соответствующих белковых полос показала, что из культуры, засеянной непосредственно в Tu-среде, выделяются жгутики, состоящие из FlaA2-флагеллина (белковая полоса **а** на рисунке 2), в то время как из культуры, росшей сначала в HS-среде выделялись жгутики, состоящие из FlaB-флагеллина (белковая полоса **б** на рисунке 2). Надо отметить, что молекулярные массы FlaA2- и FlaB-флагеллинов, рассчитанные из их аминокислотных последовательностей, составляют 47,4 (45,9) и 46,8 (45,4) кДа соответственно (в скобках приведены массы для зрелых белков, без сигнального пептида). В то же время их электрофоретическая подвижность находится на уровне 70 кДа. Аномальная электрофоретическая подвижность флагеллинов галофильных архей отмечалась и ранее и вызвана тем, что данные белки имеют высокое содержание кислых аминокислот, а также, как правило, имеют посттрансляционные модификации, в частности гликозилирование. Таким образом, нами были получены два штамма *H. marismortui*, отличающиеся белковым составом жгутиков. Данные штаммы были условно названы нами как FlaA2-штамм и FlaB-штамм. При их культивировании в Tu-среде они были стабильны и не переходили друг в друга.

Так как ген *flaA2*-флагеллина расположен на плазмиде pNG100, мы предположили, что возникновение FlaB-штамма может являться результатом утраты данной плазмиды. Используя две пары праймеров к двум различным и удаленным друг от друга участкам плазмиды pNG100, мы показали, что в клетках FlaB-штамма данная плазида действительно отсутствует. Таким образом, выделенные нами FlaA2- и FlaB-штаммы являются штаммом дикого типа и pNG100⁻ штаммом, соответственно.

Несмотря на то, что FlaB-жгутики состояли из субъединиц единственного типа они (как и FlaA2-жгутики) имели отчетливую спиральную форму (рисунок 1). Эти результаты позволили нам впервые продемонстрировать, что спиральный жгутик Эвриархей может строиться из единственного типа субъединиц. Данный факт особенно интересен тем, что ранее проведенные исследования филаментов ряда представителей царства Эвриархей показали, что для построения функционального спирального жгутика необходимо как минимум два флагеллина. Таким образом, несмотря на то что флагеллины у Эвриархей являются достаточно близкородственными белками, они могут использовать разные принципы формирования нити жгутика.

Кроме того, электронная микроскопия показала, что жгутики, состоящие из FlaA2-флагеллина, имеют толщину 20-22 нм, а состоящие из FlaB 16-18 нм. Таким образом, жгутики *H. marismortui* заметно толще описанных ранее жгутиков архей (10-14 нм) (рисунок 3).

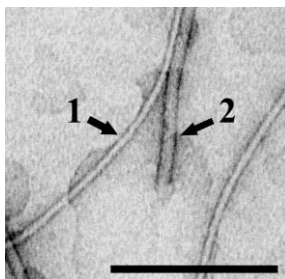


Рисунок 3. Электронно-микроскопическая фотография смеси филаментов жгутиков *H. salinarum* (1) и FlaA2-филаментов *H. marismortui* (2). Масштабная линейка 200 нм. Результаты получены совместно с Безносовым С. Н.

Следующим шагом исследования жгутиков *H. marismortui* стало выяснение вопроса о возможных отличиях в подвижности FlaA2- и FlaB-штаммов. Как уже было сказано выше, изначально клетки *H. marismortui* были описаны как в основном неподвижные. Для сравнения подвижности FlaA2- и FlaB-штаммов мы воспользовались стандартным методом микробиологии - высевам на полужидкую агаризованную среду. Через несколько дней инкубации мы обнаружили, что оба штамма образовали пятна вокруг точек посева (рисунок 4), что говорит о том, что как FlaA2- так и FlaB-штаммы являются подвижными. Интересно отметить, что размер пятна был существенно больше для культуры FlaB-штамма. Так как скорости роста клеток обоих штаммов в жидкой среде примерно одинаковы, можно сделать вывод, что при данных условиях клетки FlaB-штамма обладают более высоким уровнем подвижности.

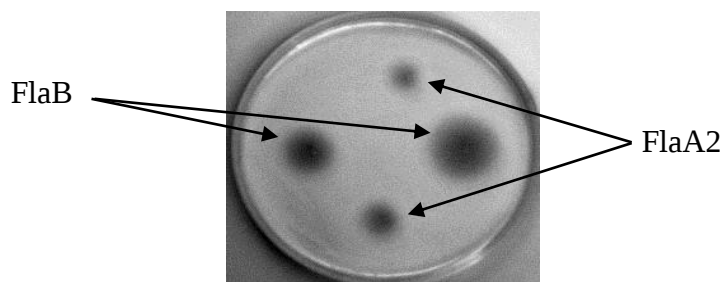


Рисунок 4. Сравнение подвижностей FlaA2- и FlaB-штаммов *H. marismortui* (0,3% агаризованная Tu-среда). Время инкубации – 5 дней (42 °C).

Анализ последовательностей флагеллинов *H. marismortui*. FlaA2 и FlaB флагеллины *H. marismortui* гомологичны друг другу (идентичность 56%) и имеют два консервативных участка в области N- и C-концов. Центральная часть флагеллинов содержит несколько высоковариабельных участков содержащих инсерции и делеции и, по-видимому, не принимает участия в формировании межсубъединичных контактов, а определяет поверхностные свойства филаментов.

Выравнивание аминокислотной последовательности FlaA2-флагеллина относительно последовательностей флагеллинов *H. salinarum* демонстрирует два высокогомолгичных региона в областях N- и C-концов. Из полученных данных можно сделать предположение, что сравнительно крупные флагеллины *H. marismortui* являются продуктом дупликации и

последующего слияния, по крайней мере, двух меньших по размеру генов флагеллинов. Кроме того, мы полагаем, что именно более крупные флагеллины приводят к тому, что филаменты *H. marismortui* превосходят по толщине филаменты ранее изученных архей.

Термодинамические свойства филаментов *H. marismortui*. Гетерогенность флагеллина в составе филаментов. Для получения дополнительной информации о структуре филаментов, состоящих из FlaA2- и FlaB-флагеллина, мы воспользовались методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии в нативных солевых условиях. На полученных кривых плавления мы наблюдали два пика теплопоглощения при температурах: 72 °С (пик 1), 80 °С (пик 2) для FlaA2-жгутиков и 55 °С (пик 1), 84 °С (пик 2) для FlaB-жгутиков (рисунок 5). Как видно, FlaB-жгутики более чувствительны к повышению температуры, чем FlaA2. Повторное прогревание как частично (пик 1), так и полностью (пик 2) денатурированных образцов жгутиков *H. marismortui* показало полную необратимость процесса тепловой денатурации.

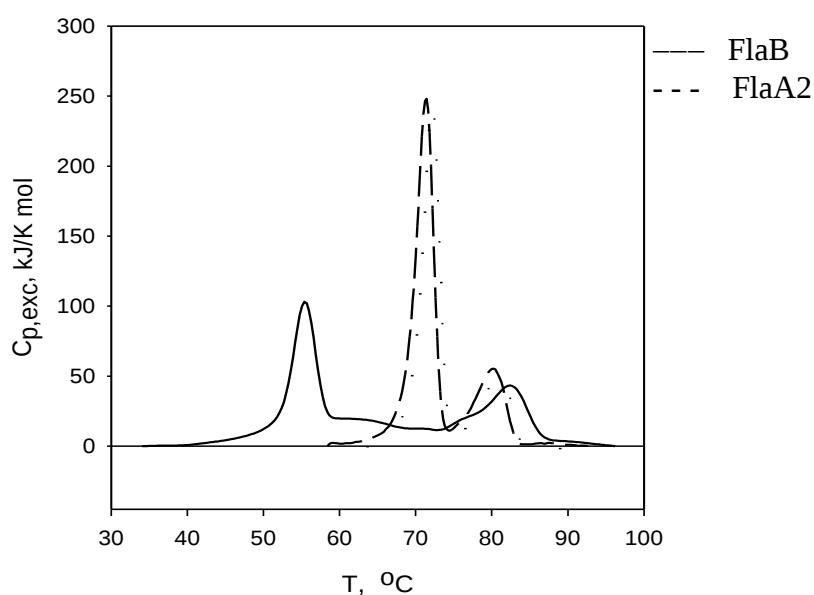


Рисунок 5. Кривые плавления препаратов FlaA2- и FlaB-жгутиков. Результаты получены совместно с Тиктопуло Е. И.

Дальнейшие исследования, проводившиеся с использованием ограниченного протеолиза, показали, что в нативных солевых условиях филаменты *H. marismortui* устойчивы к воздействию трипсина. Как уже было сказано выше, по данным сканирующей микрокалориметрии филаменты *H. marismortui* имеют два пика теплопоглощения, соответствующих кооперативному плавлению белка в составе филаментов. Данное плавление является необратимым и сопровождается потерей филаментами устойчивости к атаке трипсином. При обработке трипсином образцов, прогретых до 90 °С расщеплению подвергается практически весь флагеллин с образованием ряда продуктов протеолиза

(рисунок 6А). Для частично денатурированных (завершение плавления первого пика теплопоглощения) FlaB-филаментов наблюдается несколько иная картина: большая часть флагеллина (~80%) расщепляется за считанные минуты, в то время как некоторая часть остается нерасщепленной даже при больших временах инкубации (рисунок 6Б). Данный результат указывает на то, что в составе FlaB-филаментов присутствуют две формы флагеллина FlaB, имеющие различную доступность к атаке трипсином. Данные формы были условно обозначены нами как FlaB-г (устойчивая) и FlaB-с (чувствительная).

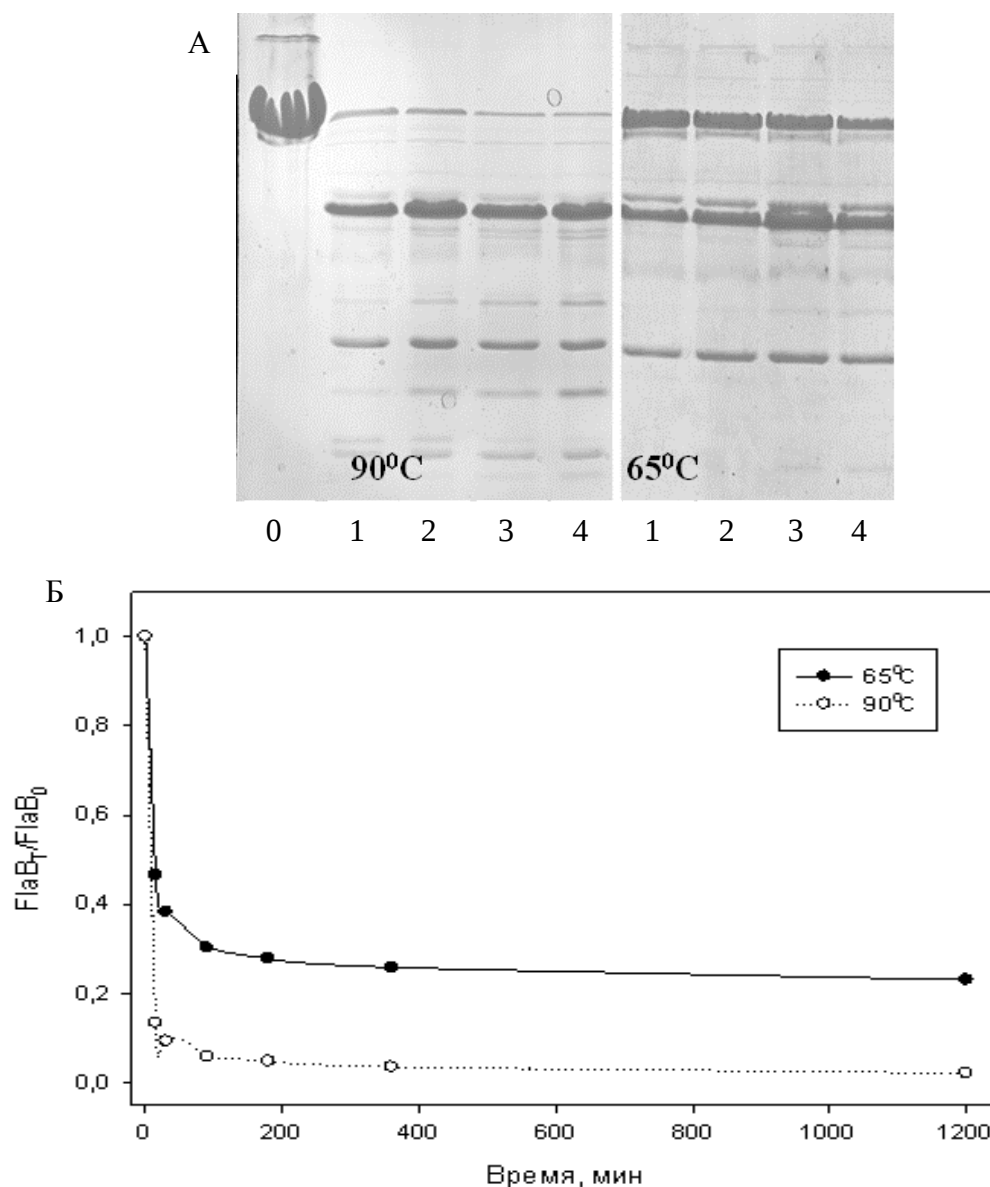


Рисунок 6. Временная зависимость трипсинолиза FlaB-филаментов *H. marismortui* после прогрева до 90 °С и 65 °С: (А) - Электрофореграмма препаратов филаментов до трипсинолиза (0), через 15, 30, 180 и 1200 мин после начала трипсинолиза (1-4, соответственно). (Б) – Изменение относительного содержания интактного флагеллина в препаратах филаментов в ходе трипсинолиза.

Мы предполагаем, что данные формы могут выполнять роль L- и R-конформаций бактериального флагеллина, которые обеспечивают формирование спирального филамента из молекул единственного белка. Мы решили проверить, являются ли FlaB-r и FlaB-s двумя различными посттрансляционными модификациями (например, гликоформами) или они, как в случае с бактериальным флагеллином, полностью идентичны, а различия между ними проявляются только в составе филамента. Сравнение электрофоретической подвижности не выявило каких-либо отличий между FlaB-r и FlaB-s, в то же время результаты анионообменной хроматографии показали, что в денатурирующих условиях FlaB-r и FlaB-s не идентичны. На рисунке 7 показаны профили элюции двух форм флагеллина FlaB (FlaB-r и FlaB-s) на анионообменной колонке моноQ в 10 mM Трис-HCl буфере (pH 9), содержащем 1% Тритон X-100 и 8M мочевины. Необходимо отметить, что для полной диссоциации архейных филаментов необходимы такие агенты, как Тритон X-100, препятствующие образованию гидрофобных контактов в белках. Как видно, профили элюции двух форм флагеллина FlaB не идентичны и имеют сложный характер: по-видимому, как FlaB-r, так и FlaB-s в отдельности не являются гомогенными и в свою очередь могут быть подразделены на несколько подформ.

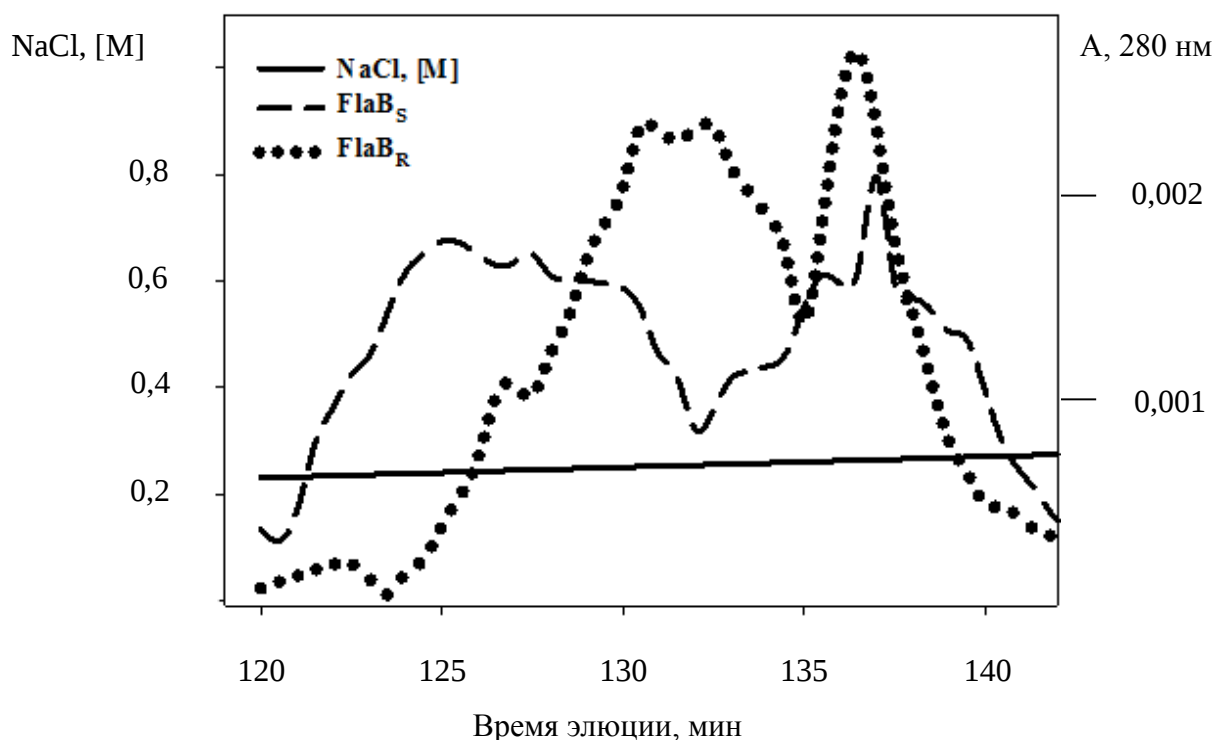


Рисунок 7. Профили элюции препаратов двух форм FlaB-флагеллина *H. marismortui*, полученные при фракционировании на анионообменной колонке моноQ.

Гликозилирование флагеллинов *H. marismortui*. Таким образом, нами было показано, что в составе филаментов FlaB-флагеллин *H. marismortui* присутствует в виде нескольких форм, отличающихся по зарядовым характеристикам. Мы предполагаем, что данные отличия являются результатом посттрансляционных модификаций флагеллинов. Флагеллины Архей как правило являются гликопротеинами с N-типом гликозилирования, однако FlaA2- и FlaB-флагеллины *H. marismortui* не содержат канонических сайтов для N-гликозилирования N-X-S(T). Для проверки факта гликозилирования данных белков мы использовали метод детекции гликопротеинов с помощью окрашивания реагентом Шиффа (рисунок 8). В качестве отрицательного контроля использовался БСА (бычий сывороточный альбумин), а в качестве положительного – жгутики *H. salinarum*.

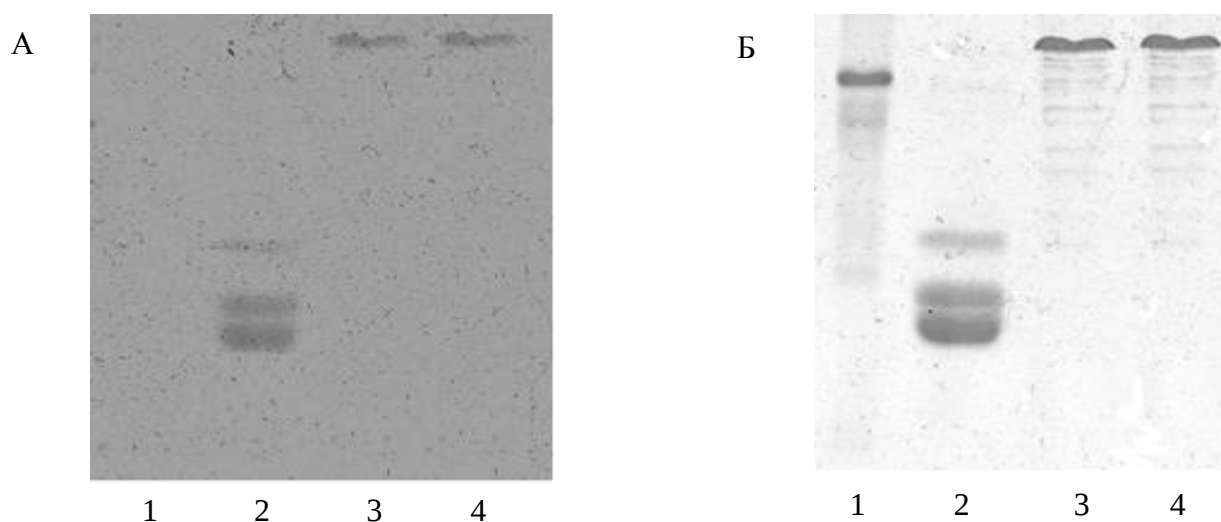


Рисунок 8. Электрофореграммы препаратов жгутиков *H. marismortui*. Окрашивание реагентом Шиффа (А) и кумасси R-250 (Б). Трек: 1) БСА; 2) жгутики *H. salinarum*; 3) FlaA2; 4) FlaB.

Как видно из приведенных результатов, окраска реагентом Шиффа дала положительный результат для обоих флагеллинов *H. marismortui*. Однако, в отличие от флагеллинов *H. salinarum* окраска флагеллинов *H. marismortui* была нестабильна. Для того чтобы убедиться, что флагеллины *H. marismortui* являются гликопротеинами, мы провели дополнительную проверку с использованием CHN-анализа, который показал существенное завышение измеренного соотношения C/N ($3,50 \pm 0,08$ для обоих флагеллинов) в сравнении с теоретически рассчитанным из аминокислотной последовательности (3,2 для FlaB и 3,204 для FlaA2). Таким образом, мы подтвердили тот факт, что флагеллины *H. marismortui* являются гликопротеинами. При этом имеет место либо N-гликозилирование по неканоническому сайту, либо какой-то иной тип гликозилирования (например, O-

гликозилирование). В последнее время появились публикации о случаях нестандартного гликозилирования у эукариот, но для архей подобные случаи пока не описаны.

Роль избыточности по генам флагеллинов у *H. marismortui*. Как нами было показано, FlaB-флагеллин *H. marismortui* способен в одиночку формировать функциональный жгутик. Таким образом, оставалась неясной биологическая роль кодируемого плазмидой pNG100 FlaA2-флагеллина. Так как флагеллины сильно отличаются по термостабильности, мы предположили, что избыточность по генам флагеллинов данного организма может быть механизмом адаптации к изменениям условий окружающей среды. Известно, что стабильность галофильных белков зависит от солености среды, поэтому для проверки нашего предположения мы проверили подвижность FlaA2- и FlaB-штаммов на полужидкой агаризованной среде при различных значениях температуры и солености (рисунок 9). Данные эксперименты показали, что в условиях высокой температуры/низкой солености клетки FlaB-штамма теряют свою подвижность в отличие от клеток FlaA2-штамма, однако при увеличении солености среды подвижность клеток FlaB-штамма восстанавливается и в условиях 30% солености и 40 °C становится даже выше, чем у клеток FlaA2-штамма.

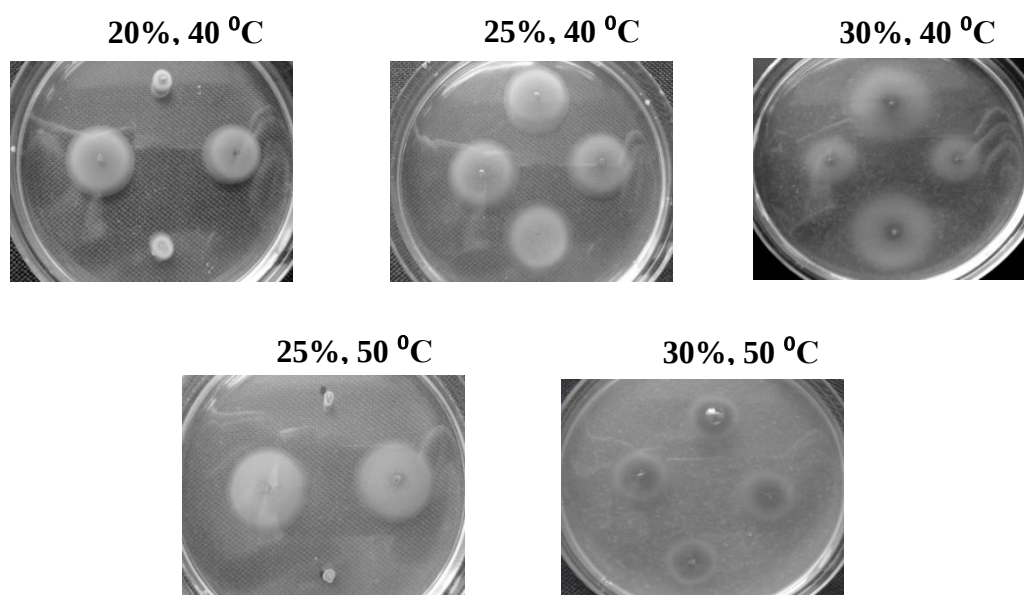


Рисунок 9. Подвижность FlaA2 и FlaB штаммов при различных значениях соленостей (%) и температур (°C). Пятна FlaA2 штамма слева и справа, FlaB – сверху и снизу.

Мы предположили, что наблюдаемый эффект является результатом того, что в условиях высокой температуры/низкой соли FlaB-флагеллин частично денатурирован и не

способен формировать функциональный жгутик. Для проверки данного предположения мы провели выделение жгутиков из культур FlaA2- и FlaB-штаммов, выросших при тех же самых условиях в жидкости (рисунок 10). Результат данного эксперимента показал, что клетки FlaB-штамма не синтезируют жгутиков в тех условиях, в которых они были неподвижны на полужидкой агаризованной среде. Неожиданным результатом оказалось то, что при 30% солености и 50 °C клетки FlaB-штамма не синтезировали жгутики в жидкости, хотя были подвижны на полужидкой агаризованной среде. Данный результат указывает на то, что синтез жгутиков при росте на полужидкой и жидкой средах регулируется по-разному.

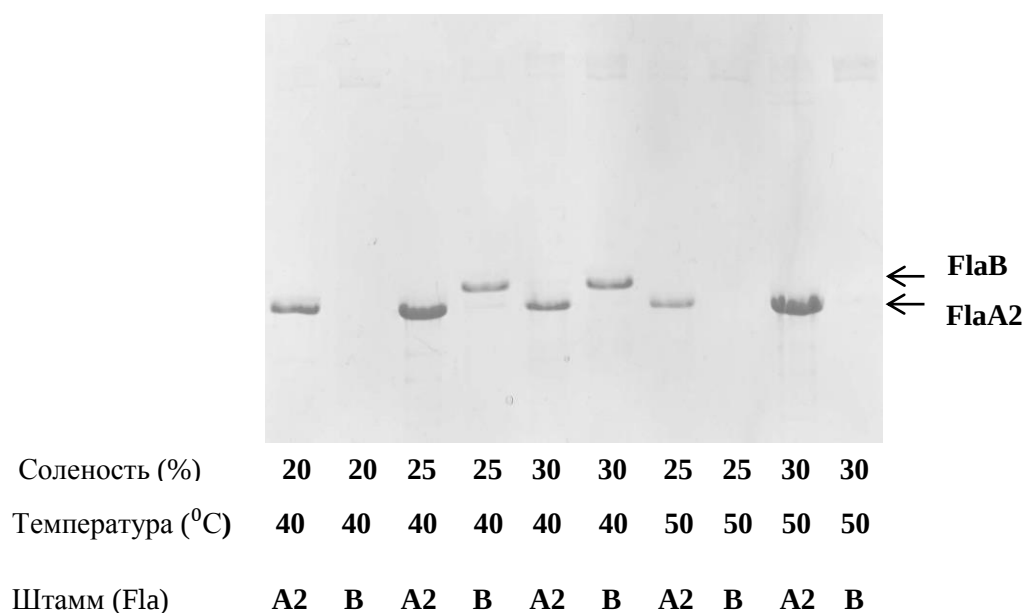


Рисунок 10. Электрофореграмма жгутиков, выделенных из суспензии FlaA2- и FlaB-штаммов, выросших при различных условиях.

Таким образом мы показали, что избыточность по генам флагеллинов *H. marismortui* выполняет адаптивную функцию. Мы связываем это с тем, что для Мертвого моря (откуда и был выделен археон *H. marismortui*) характерна цикличность температур и соленостей, при этом в зимнее время над ним выпадают обильные дожди, что приводит к резкому снижению солености вблизи поверхности. В таких условиях клетки FlaA2-штамма будут иметь селективные преимущества.

Как уже было сказано выше, множественность флагеллиновых генов широко распространена среди архей, однако до настоящего времени данную множественность связывали лишь с тем, что продукт каждого из генов необходим для формирования функционального жгутика. В данной работе мы впервые показываем, что множественность

флагеллиновых генов может быть одним из механизмов адаптации архей к меняющимся условиям окружающей среды.

Изучение свойств жгутиков *Halorubrum lacusprofundi*. Изучение аппарата подвижности *H. marismortui* позволило нам впервые продемонстрировать, что функциональный спиральный жгутик галофильных архей может строиться только из одного флагеллина. Данный результат позволил установить, что ранее обнаруженный принцип, когда для формирования спиральной нити необходимо как минимум два различных флагеллина не является универсальным у Эвриархей. Мы решили установить, является ли *H. marismortui* в этом плане уникальным организмом, или же и другие галофильные археи могут формировать функциональный жгутик из субъединиц единственного белка. В последнее время резко выросло число архей, у которых были секвенированы геномные последовательности, среди них есть и такие, геномы которых содержат единственный флагеллиновый ген. Один из таких организмов, а именно, *Halorubrum lacusprofundi*, был выбран нами в качестве объекта изучения. Этот организм ранее считался неподвижным, но нам впервые удалось продемонстрировать, что несмотря на наличие единственного гена флагеллина данный организм формировал спиральные жгутики и был подвижен. При этом для жгутиков *H. lacusprofundi* наблюдалось явление полиморфизма, проявляющееся в различной амплитуде спиралей, а также наличии кольцевых форм (рисунок 11).

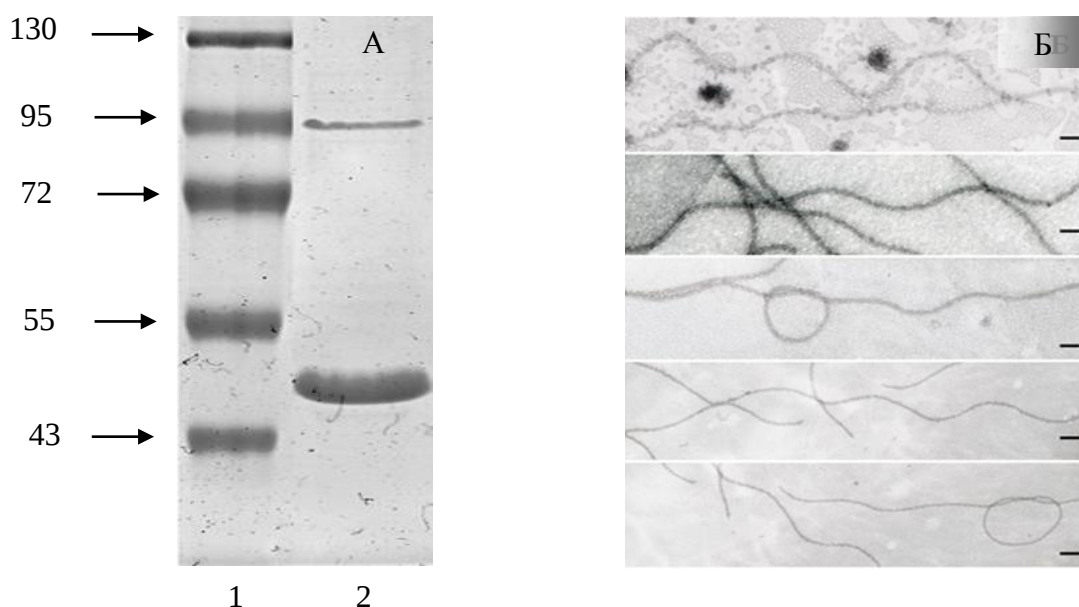


Рисунок 11. Филаменты *H. lacusprofundi*: А) Электрофорез в ДСН-ПААГ: 1) белковые маркеры (кДа); 2) препарат филаментов (присутствует полоса флагеллина и его димера). Б) Электронно-микроскопические фотографии филаментов. Масштабная линейка 100 нм. Результаты получены совместно с Безносовым С. Н.

Использование анионообменной хроматографии позволило, как и в случае *H. marismortui*, выявить несколько форм флагеллина, отличающиеся по хроматографическим характеристикам (рисунок 12). Данный результат служит дополнительным доказательством того факта, что спиральный жгутик галофильных архей может строиться только из одного типа субъединиц.

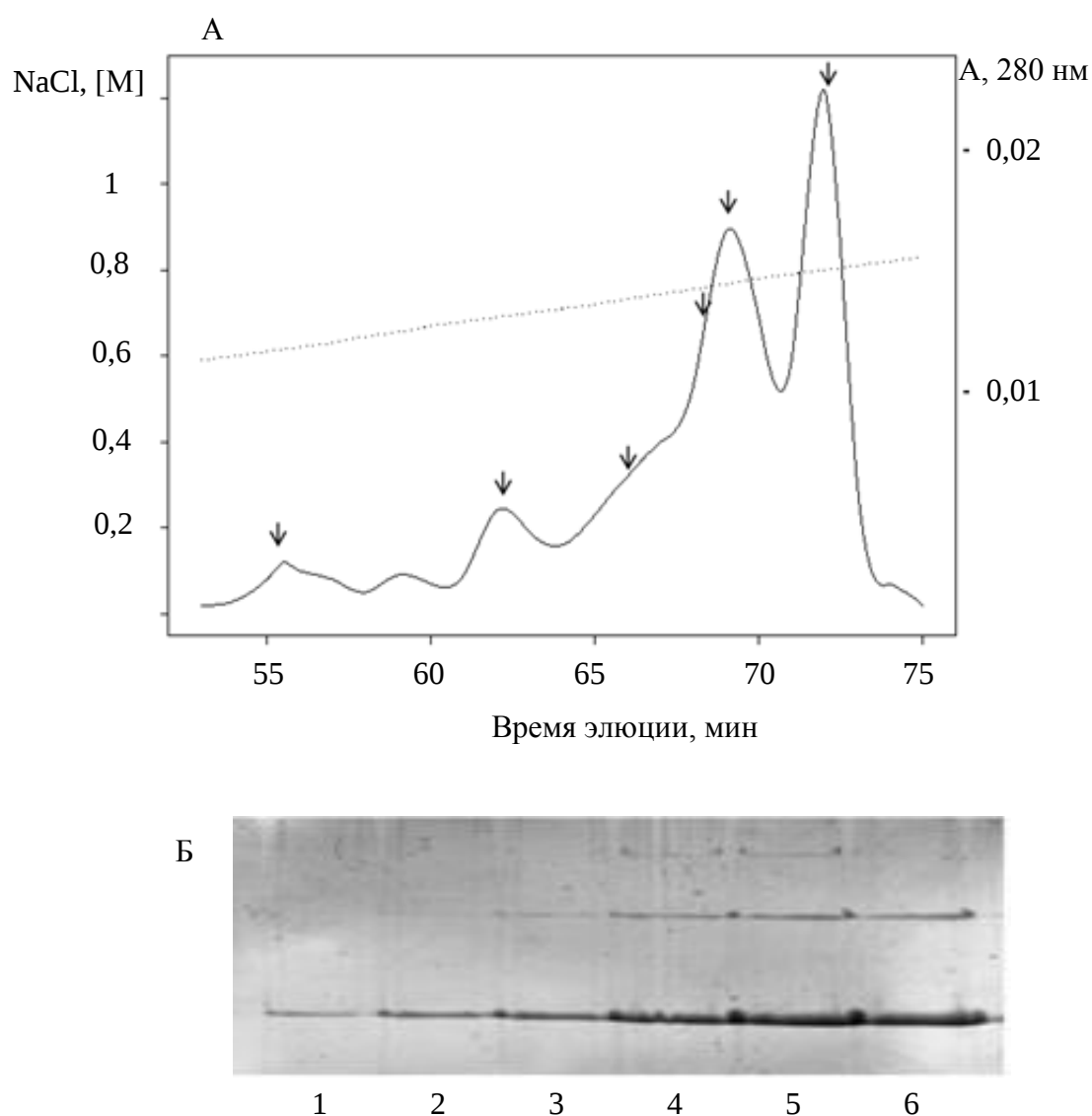


Рисунок 12. Гетерогенность флагеллина *H. lacusprofundi*. А) Профиль элюции, полученный при фракционировании с помощью анионообменной хроматографии флагеллиновых форм *H. lacusprofundi*. Б) электрофореграмма флагеллин-содержащих фракций, отмеченных стрелками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как уже было сказано, жгутики бактерий и архей являются принципиально разными структурами, схожими лишь внешне. Данное внешнее сходство вызвано тем, что жгутики бактерий и архей являются функциональными аналогами, и для работы в качестве гребного винта они должны быть спиральны. Механизм спирализации бактериальных филаментов был изучен в деталях, и на основании анализа был сделан вывод о том, что для спирализации нити жгутика субъединицы флагеллина должны быть неидентичны. В то же время, аппарат жгутиковой подвижности архей является крайне слабо изученным, и для нас представляет интерес, каким образом столь различные органеллы способны формировать схожую надмолекулярную структуру. Проведенные ранее в нашей группе исследования аппарата подвижности галофильного археона *H. salinarum* показали, что для спирализации нити жгутика данного организма необходимы как минимум два различных флагеллина, из чего был сделан вывод о том, что у данного организма два флагеллина могут быть аналогами двух конформационных состояний единственного флагеллина Энтеробактерий. Так как множественность флагеллиновых генов широко распространена среди архей, было выдвинуто предположение о том, что данный принцип является универсальным в домене Архей. С целью проверки данного предположения мы начали работу с *H. marismortui*. Данный организм привлек наше внимание необычным расположением генов флагеллинов – на разных репликонах, а также большим размером генов флагеллинов (примерно вдвое крупнее флагеллинов *H. salinarum*). Исследование данного организма позволило нам установить, что он обладает подвижностью, опосредованной жгутиками, при этом мы впервые продемонстрировали, что спиральный и функциональный жгутик галофильных архей может строиться исключительно из одного типа субъединиц. Данный результат показал, что принцип построения нити жгутика, обнаруженный на *H. salinarum* не является универсальным. Кроме того, мы показали, что жгутики *H. marismortui* заметно толще жгутиков, ранее исследованных архей. Мы полагаем, что это является результатом того, что флагеллины *H. marismortui* примерно вдвое крупнее большинства архейных флагеллинов (45,9 кДа для FlaA2-флагеллина и 45,4 кДа для FlaB-флагеллина) и, по-видимому, являются продуктом дупликации и последующего слияния более типичных небольших флагеллинов, подобных флагеллинам *H. salinarum* (19,2 кДа для FlgA1 *H. salinarum*). Можно сделать предположение, что именно удвоенный размер флагеллинов *H. marismortui* позволяет им строить спиральный филамент, за счет того, что они, в некотором приближении, являются двумя флагеллинами в составе одной полипептидной цепи. Однако наши результаты по исследованию филаментов *H. lacusprofundi* показали, что спиральный жгутик может строиться и из относительно небольшого флагеллина (23,6 кДа). На данный момент

механизм построения спиральной надмолекулярной структуры, каковой является нить жгутика архей остается неизвестным. Однако, на основании полученных нами данных, а также из общего принципа, согласно которому для формирования суперспирали необходимо, чтобы субъединицы, формирующие филамент, были неидентичны, мы можем предположить, что спирализация нити жгутиков *H. marismortui* и *H. lacusprofundi* может осуществляться за счет того, что флагеллины данных организмов могут находиться в различных конформациях. Косвенным подтверждением этого является тот факт, что субъединицы флагеллина в составе филаментов данных организмов не идентичны по своей доступности к атаке трипсином (для FlaB-флагеллина *H. marismortui*) и зарядовым характеристикам. При этом разница в зарядовых характеристиках может являться результатом различной степени постраницационных модификаций (гликозилирования) субъединиц флагеллина, вследствие их разной конформации. В настоящее время, из-за отсутствия данных о точной пространственной структуре флагеллина в составе архейных жгутиков, вопрос о точном механизме спирализации филамента остается открытым.

Другим интересным вопросом для нас было выяснить, для чего *H. marismortui* нужны два гена флагеллина, хотя функциональный жгутик может строиться только из одного. Наши исследования показали, что данная избыточность по генам флагеллинов носит адаптивный характер, и наличие плазмиды, несущей ген FlaA2-флагеллина, позволяет клеткам сохранять подвижность в условиях, при которых FlaB-флагеллин не способен формировать нить жгутика. Таким образом, мы впервые показали, что множественность флагеллиновых генов у архей может играть роль в адаптации к меняющимся условиям окружающей среды.

ВЫВОДЫ

- 1) Обнаружено, что культура *H. marismortui* может содержать клетки, отличающиеся белковым составом филаментов жгутиков.
- 2) Показано, что спиральные филаменты жгутиков галофильных архей могут собираться из одного типа флагеллина.
- 3) Охарактеризованы нити жгутиков *H. marismortui*, построенные из FlaA2- и из FlaB-флагеллинов.
- 4) Показано наличие двух форм флагеллина в составе FlaB-филаментов.
- 5) Показано, что флагеллины *H. marismortui* являются гликопротеинами с необычным типом гликозилирования.
- 6) Показано, что избыточность по генам флагеллинов *H. marismortui* является механизмом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК РФ:

1) Pyatibratov M. G., Beznosov S. N., Rachel R., Tiktopulo E. I., Surin A. K., Syutkin A. S., Fedorov O. V. Alternative flagellar filament types in the haloarchaeon *Haloarcula marismortui*. // Canadian Journal of Microbiology. 2008. V. 54. № 10. P. 835-844.

2) Сюткин А. С., Пятибратов М. Г., Безносов С. Н., Федоров О. В. Различные механизмы формирования спиральности галоархейных жгутиков. // Микробиология. 2012. Т. 81. № 5. С. 620-629.

3) Syutkin A. S., Pyatibratov M. G., Galzitskaya O. V., Rodríguez-Valera F., Fedorov O. V. *Haloarcula marismortui* archaellin genes as ecoparalogs. // Extremophiles. 2014. V. 18. № 2. P. 341-349.

Тезисы докладов:

1) Beznosov S. N., Pyatibratov M. G., Syutkin A. S., Alatyrev A. G., Fedorov O. V. Unique traits of *Haloarcula marismortui* flagellar filaments. // International Conference “Protein Biosynthesis, Structure and Function”. Russia. Pushchino. 2007. P. 84.

2) Syutkin A. S., Beznosov S. N., Pyatibratov M. G., Tiktopulo E. I., Fedorov O. V. Unique traits of *Haloarcula marismortui* flagellar filaments. // International Symposium “Biological Motility: Achievements and Perspectives”. Russia. Pushchino. 2008. P. 276-277.

3) Syutkin A. S., Pyatibratov M. G., Fedorov O. V. *Haloarcula marismortui* flagellins as ecoparalogs. // International Symposium “Biological Motility: from fundamental achievements to nanotechnologies”. Russia. Pushchino. 2010. P. 275-276.

4) Syutkin A. S., Yu X., Egelman E., Pyatibratov M. G. Surprising properties of *Haloarcula marismortui* flagellar filaments. // A Biochemical Society Focused Meeting “Molecular biology of Archaea II”. UK. Cambridge. 2010. P. 13.

5) Syutkin A. S., Pyatibratov M. G., Beznosov S. N., Fedorov O. V. Helicity of flagellar filaments in different haloarchaea can be provided by different mechanisms. // International Symposium “Biological Motility: Fundamental and Applied Science”. Russia. Pushchino. 2012. P. 208-210.

6) Сюткин А. С., Безносков С. Н., Пятибратов М. Г. Различные механизмы спирализации жгутиков галофильных архей. // Ежегодная научная конференция Института белка РАН. Россия. Пущино. 2012. С. 14.

7) Pyatibratov M. G., Beznosov S. N., Syutkin A. S., Galeva A. V., Fedorov O. V. Variety of molecular organization of haloarchaeal flagellar filaments. // International Symposium “Biological Motility: New facts and hypothesis”. Russia. Pushchino. 2014. P. 216-218.

8) Syutkin A. S., Pyatibratov M. G., Beznosov S. N., Fedorov O. V. Investigation of molecular organization of the *Haloarcula marismortui* archaeellar filaments. // International Symposium “Biological Motility: New facts and hypothesis”. Russia. Pushchino. 2014. P. 297-299.

9) Syutkin A., Pyatibratov M., Fedorov O. Role of the archaellin genes redundancy in *Haloarcula marismortui*. // International conference “Molecular biology of Archaea 4”. France. Paris. 2014. P. 102.