

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ БЕЛКА

РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Сюткин Алексей Сергеевич

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЖГУТИКОВ

HALOARCULA MARISMORTUI

03. 01. 03 – молекулярная биология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

Пятибратов М. Г.

Пушино – 2014

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1. Жгутиковая подвижность бактерий.....	12
1. 1. Общая характеристика	12
1. 2. Строение и сборка бактериального жгутика.....	13
1. 3. Ультраструктура филамента.....	17
1. 4. Множественность флагеллиновых генов у бактерий.....	19
2. Краткая характеристика бактериальных пилей IV-го типа	20
2. 1. Общие сведения	20
2. 2. Ультраструктура пилей IV-го типа	23
2. 3. Сборка пилей IV-го типа.....	24
3. Жгутиковая подвижность Архей.....	27
3. 1. Общая характеристика	27
3. 2. Организация генов аппарата подвижности Архей	29
3. 3. Регуляция сборки аппарата жгутиковой подвижности Архей.....	31
3. 4. Исследование структуры жгутика Архей.....	33
3. 5. Гликозилирование белков у Архей	37
3. 6. Эксперименты по инаktivации генов флагеллинов	39
4. Другие поверхностные структуры архей.....	41
4. 1. Краткая характеристика других поверхностных структур архей.....	41
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	44
5. Материалы и методы исследования.....	44

5. 1. Химические реагенты и ферменты	44
5. 2. Буферы и другие растворы, использованные в работе	45
5. 3. Среды.....	46
5. 4. Штаммы микроорганизмов.....	46
5. 5. Плазмиды	47
5. 6. Методы.....	47
5. 6. 1. Выделение плазмидной ДНК.....	47
5. 6. 2. Выделение тотальной ДНК <i>H. marismortui</i>	47
5. 6. 3. Полимеразная цепная реакция	48
5. 6. 4. Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции	48
5. 6. 5. Электрофорез ДНК в геле агарозы	49
5. 6. 6. Очистка фрагментов ДНК.....	49
5. 6. 7. Лигирование ДНК.....	49
5. 6. 8. Использование Т-вектора для клонирования ПЦР-продуктов	49
5. 6. 9. Получение компетентных клеток <i>Escherichia coli</i>	49
5. 6. 10. Трансформация компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> плазмидной ДНК.....	50
5. 6. 11. Инактивация гена <i>flaB H. marismortui</i>	50
5. 6. 12. Выделение жгутиков	52
5. 6. 13. Электрофорез белков в ДСН-ПААГ	52
5. 6. 14. Специфическое окрашивание для идентификации гликопротеинов	53
5. 6. 15. Сканирующая микрокалориметрия	53

5. 6. 16. Масс-спектрометрия.....	54
5. 6. 17. Электронная микроскопия.....	54
5. 6. 18. Ограниченный протеолиз филаментов <i>H. marismortui</i>	55
5. 6. 19. Изучение гетерогенности флагеллинов <i>H. marismortui</i> и <i>H. lacusprofundi</i>	55
5. 6. 20. Трансформация клеток <i>H. marismortui</i>	56
5. 6. 21. Получение поликлональных антител	57
5. 6. 22. Иммуноблоттинг.....	57
5. 6. 23. СНН-анализ	58
5. 6. 24. Выделение триптического фрагмента FlaB-флагеллина <i>H. marismortui</i> (TF-FlaB) и определение его границ	58
5. 6. 25. Биоинформатический анализ флагеллинов <i>H. marismortui</i>	59
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	60
6. Изучение молекулярной организации жгутиков	60
<i>H. marismortui</i>	60
6. 1. Выделение и характеристика жгутиков <i>H. marismortui</i>	60
6. 2. Сканирующая микрокалориметрия.....	72
6. 3. Анализ последовательностей флагеллинов <i>H. marismortui</i>	74
6. 4. Обнаружение гетерогенности FlaB-флагеллина в составе филаментов ...	77
6. 5. Гликозилирование флагеллинов <i>H. marismortui</i>	81
6. 6. Выделение структурного домена FlaB-флагеллина <i>H. marismortui</i>	83
6. 7. Роль избыточности по генам флагеллинов у <i>H. marismortui</i>	86
6. 8. Биоинформатический анализ флагеллинов <i>H. marismortui</i>	92

7. Исследование молекулярной организации жгутиков <i>Halorubrum lacusprofundi</i>	96
7. 1. Изучение свойств жгутиков <i>H. lacusprofundi</i>	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
ВЫВОДЫ	104
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	105

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДМСО - диметилсульфоксид

ДСН –додецилсульфат натрия

МБА - N,N-метиленбисакриламид

ПААГ – полиакриламидный гель

ПСА – персульфат аммония

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ТЕМЕД - N,N,N,N–тетраметилэтилендиамин

Трис – трис (гидроксиметил) аминометан

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ВВЕДЕНИЕ

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 (Woese et al., 1977). Многие представители данной группы организмов являются экстремофилами, то есть занимают экологические ниши с экстремальными значениями температур (термофилы), рН (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 (Воробьева, 2007). 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 (Calladine, 1978).

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 (Chaban et al., 2007). 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 (Tarasov et al., 2000; Тарасов и др., 2004). 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).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жгутиковая подвижность бактерий

1. 1. Общая характеристика

Аппарат жгутиковой подвижности является одним из механизмов, позволяющих бактериям перемещаться в жидкой среде (Berg and Anderson, 1973). Морфологически жгутик представляет собой протяженную спиральную нить, толщина которой составляет около 20 нм и длиной 10-15 мкм. Количество и расположение жгутиков у разных видов бактерий может сильно отличаться, при этом жгутики могут располагаться как полярно, так и латерально. По характеру расположения жгутиков и их количеству подвижные бактерии условно делят на четыре группы (рисунок 1): 1) монотрихи — один полярно расположенный жгутик (*Vibrio metschnikovii*); 2) лофотрихи — пучок жгутиков на одном полюсе (*Pseudomonas*, *Chromatium*); 3) амфитрихи — пучки жгутиков на обоих полюсах клетки (*Spirillum*); 4) перитрихи — множество жгутиков, расположенных по бокам клетки или на всей поверхности (*Escherichia coli*) (Шлегель, 1987).

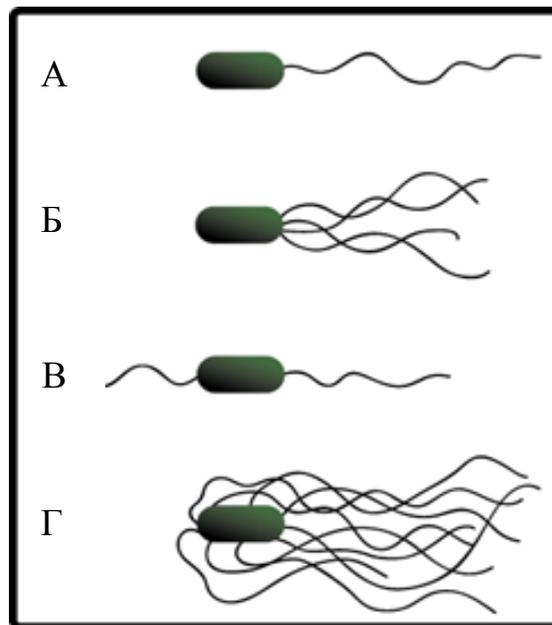


Рисунок 1. Классификация бактерий на основе количества и расположения жгутиков: А) монотрих; Б) лофотрих; В) амфитрих; Г) перитрих. Рисунок взят из свободного хранилища Wikimedia Commons.

Спиральная извитая нить жгутика приводится во вращательное движение “мотором”, находящимся в цитоплазматической мембране. Вращаясь, жгутик создает гидродинамическое усилие, проталкивающее клетку в окружающей жидкой среде. Жгутик попеременно вращается по часовой стрелке или против часовой стрелки. Частота вращения постоянна для конкретного организма и составляет до нескольких сот оборотов в секунду (Ryu et al., 2000). Скорость движения клеток при использовании жгутика у разных организмов может сильно отличаться и для *E. coli* составляет 45 ± 5 мкм/с, а для наиболее быстрых вибрионов доходит до 200 мкм/с (Пиневич, 2007; Herzog and Wirth, 2012).

1. 2. Строение и сборка бактериального жгутика

Бактериальный жгутик является сложной структурой, состоящей примерно из 25 белков (Berg and Anderson, 1973; Namba and Vonderviszt, 1997; Macnab, 2003; Kojima and Blair, 2004; Chevance and Hughes, 2008). Основные принципы строения и работы бактериального жгутика были изучены на примере *E. coli* и *Salmonella enterica*.

Структурно в составе жгутика можно выделить три части: 1) базальное тело (Berg and Anderson, 1973; Silverman and Simon, 1974); 2) гибкий крюк, соединяющий мотор и филамент; 3) жесткий филамент (DePamphilis and Adler, 1971a, б). Схематическое строение жгутика представлено на рисунке 2.

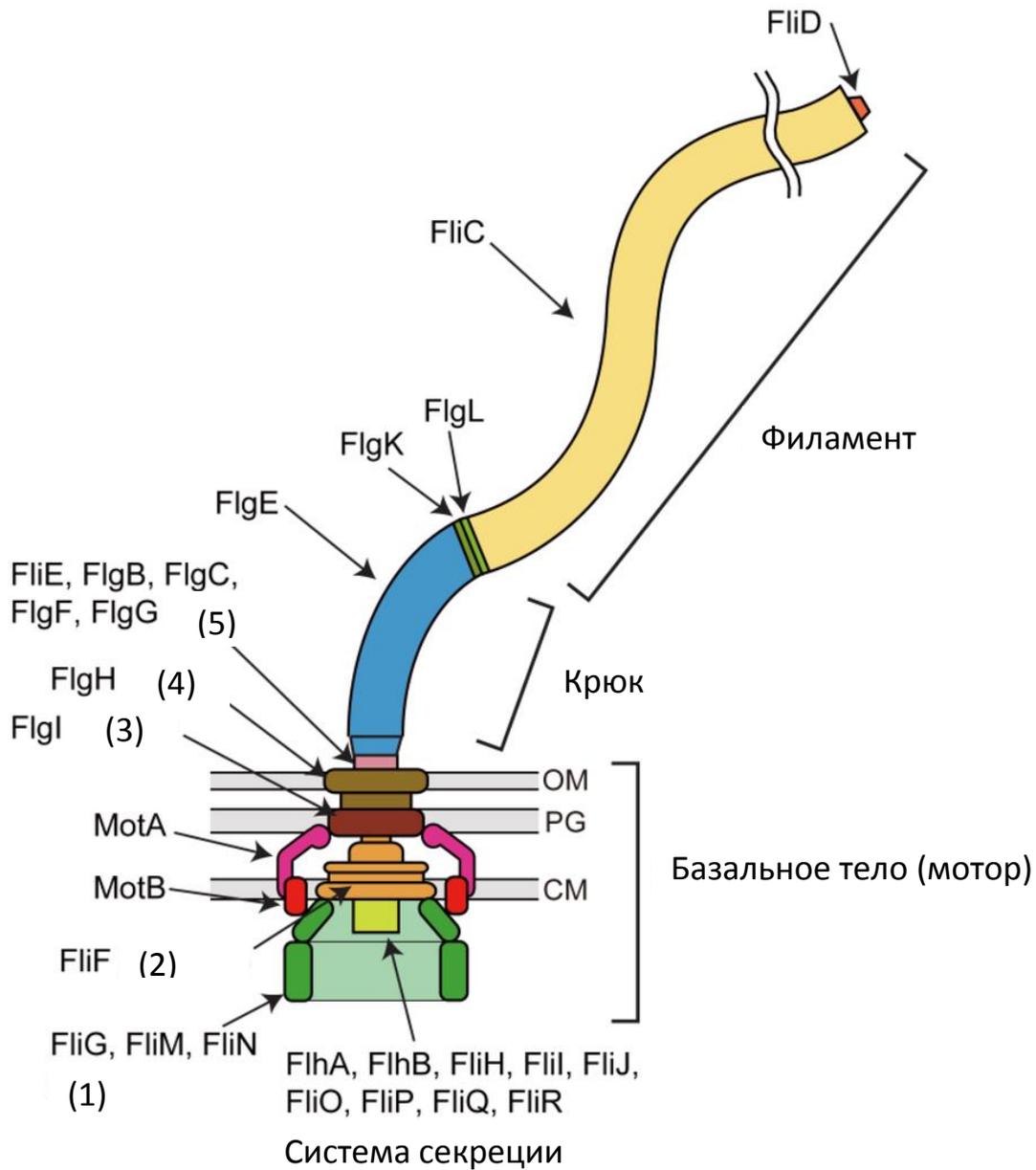


Рисунок 2. Строение бактериального жгутика. CM – цитоплазматическая мембрана; PG – пептидогликан; OM – внешняя мембрана; 1 – С-кольцо; 2 – MS-кольцо; 3 – P-кольцо; 4 – L-кольцо; 5 – стержень. Рисунок с изменениями взят из (Morimoto and Minamino, 2014).

Надо сказать, что биогенез жгутика является очень энергозатратным процессом и поэтому находится под контролем регуляторных систем, реагирующих на изменения окружающей среды. Сборка жгутика начинается с образования во внутренней мембране MS-кольца (состоящего из белка FliF), с дальнейшим прикреплением комплекса белков С-кольца FliG, FliM и FliN (образующих так называемый “switch complex”, отвечающий за изменение направления вращения мотора) с цитоплазматической стороны от MS-кольца. После завершения формирования С-кольца белки мотора MotA и MotB образуют статорный комплекс во внутренней мембране. Данный комплекс формирует канал для потока протонов и нековалентно прикреплен к пептидогликановому слою за счет периплазматического домена белка MotB, в то время как ротор (состоит из белка FliG) нековалентно прикреплен к MS-кольцу. Вместе ротор и статор образуют жгутиковый мотор, создающий вращательный момент за счет градиента протонов или, реже, ионов натрия (Macnab, 2003; Chevance and Hughes, 2008).

После завершения сборки С-кольца, в основании базального тела идет сборка жгутик-специфической системы секреции третьего типа (Aizawa, 1996). Данная структура обеспечивает экспорт большинства внецитоплазматических компонентов жгутика (Paul et al., 2008). После формирования данной системы, происходит секреция и постепенная сборка компонентов стержня: белков FliE, FlgB, FlgC, FlgF (образуют проксимальную часть) и белка FlgG (формирует дистальную часть) (Minamino et al., 2000). Экспорт белка FlgI и липопротеина FlgH, образующих Р- и L-кольцо соответственно, происходит, по-видимому, за счет альтернативного пути секреции белков (Sec-путь). Сборка периплазматического Р-кольца и L-кольца внешней мембраны зависит от формирования предыдущей структуры – стержня. После завершения формирования стержня и всех колец происходит сборка крюка, состоящего из белка FlgE. Крюк выполняет функцию гибкого сочленения, соединяя мотор со спиральным филаментом и, таким образом, позволяет передачу вращательного момента, даже если мотор и филамент находятся не на одной оси (Berg and

Anderson, 1973). Крюк состоит приблизительно из 120 субъединиц белка FlgE и организован в 11 протофиламентов закрученных по спирали. Длина крюка составляет 55 ± 6 нм и строго контролируется (Hirano et al., 1994; Macnab, 2003; Chevance and Hughes, 2008).

На последнем этапе сборки жгутика идет секреция анти- σ^{28} фактора FlgM (Hughes et al., 1993), что приводит к σ^{28} -зависимой экспрессии жгутиковых генов, находящихся под контролем промотора 3-го класса с последующей сборкой жгутик-ассоциированных белков FlgK, FlgL и FliD (Homma et al., 1990). После чего происходит сборка филамента из субъединиц структурного белка - флагеллина (FliC). Рост нити жгутика осуществляется путем самосборки субъединиц флагеллина на дистальном конце жгутика, куда они транспортируются в развернутом виде через узкий канал, проходящий внутри жгутика. В недавней работе было показано, что субъединицы флагеллина, находящиеся в канале жгутика, связаны между собой по принципу “голова к хвосту” за счет своих N- и C-концевых спиралей, образуя своеобразную “цепь” (Evans et al., 2013). На самом конце филамента находится кэп-структура, состоящая из субъединиц белка FliD, помогающая полимеризации флагеллина. Электронно-микроскопические исследования показали, что данный кэп является пентамером и прикреплен к дистальному концу жгутика за счет своих пяти заякоривающих доменов (Yonekura et al., 2000). Данные пять доменов отделены друг от друга, благодаря этому в кэпе имеется пять брешей, через которые молекулы флагеллина выходят наружу. Во время данного процесса кэп придает им свернутую конформацию и, таким образом, играет роль экзоплазматического шаперонина. Полимеризация флагеллина сопровождается вращением данной структуры - сборка примерно 55 субъединиц флагеллина приводит к одному полному обороту кэпа (Yonekura et al., 2000; Maki-Yonekura et al., 2003).

1. 3. Ультраструктура филамента

Филамент жгутика формируется из 11 закрученными спирально протофиламентами (единственным известным исключением является *Campylobacter jejuni*, у которой филамент состоит из 7 протофиламентов (Galkin et al., 2008)), которые в свою очередь состоят из тысяч мономеров единственного белка – флагеллина. Данный белок может находиться в двух возможных конформациях – названных L- и R-конформациями, при этом мономеры отдельного взятого протофиламента находятся только в одной конформации. Межсубъединичное расстояние в L-форме больше на 0,8 Å, чем в R-форме, при этом L-формы протофиламентов оказываются слегка длиннее. Как правило, нить жгутика состоит как из L-, так и из R-форм протофиламентов одновременно. Согласно признанной к настоящему времени модели полиморфизма нити жгутика (Calladine, 1978) между соседними рядами (протофиламентами) разного типа (L и R) возникают силы натяжения (как следствие разной длины L- и R-протофиламентов), благодаря которым и происходит закручивание нити в спираль, при этом более короткие R-протофиламенты формируют внутреннюю поверхность спирали. Параметры спиральности нити (диаметр спирали, шаг) зависят от соотношения типов протофиламентов, существует 12 таких соотношений и соответственно форм нити: десять изогнутых (смесь L- и R-протофиламентов) и две прямые (только R- или только L-формы). Например, у *Salmonella* в определенных условиях нить жгутика составлена из 9L- и 2R-типа протофиламентов, что дает левозакрученную спиральность нити. При переходе двух протофиламентов L-формы в R-форму нить принимает правозакрученную спиральность. Способность бактериальных флагеллинов к L\R-переходам была продемонстрирована на атомной модели с высоким разрешением (2,0 Å) закристаллизованного фрагмента флагеллина. Получить кристаллы фрагмента флагеллина *Salmonella enterica* с массой 41,3 кДа удалось после удаления части C- и N-концевых участков, отвечающих за полимеризацию (Samatey et al., 2001). На рисунке 3 изображен углеродный остов фрагмента F41, в котором выделили три

домена: D1, D2, D3. D1 содержит N-концевой сегмент с 56 по 176 аминокислотный остаток, и C-концевой сегмент с 402 по 450 аминокислотный остаток. В домене D2 обозначили два сегмента: с 177 по 189 аминокислотный остаток и с 284 по 401 аминокислотный остаток. Центральная часть, с 190 по 283 аминокислотный остаток, представляет собой домен D3.

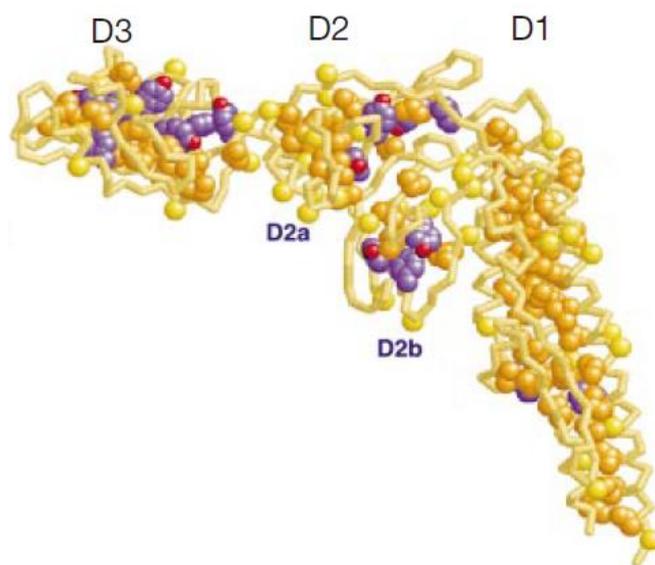


Рисунок 3. Доменная структура фрагмента флагеллина F41 *S. enterica*. D1, D2, D3, D2a и D2b – выделяемые в структуре домены и субдомены, соответственно. Рисунок взят из (Samatey et al., 2001).

Получить кристаллы флагеллина удалось только в конформации R-типа. В полученном фрагменте был идентифицирован регион, отвечающий за переход из одной формы нити в другую. Для поиска в структуре F41 района, ответственного за L\R-переход, была использована модель протофиламента, составленного из трех субъединиц – мономеров R-типа. Методом компьютерного моделирования структуру трехсубъединичного протофиламента вытягивали, отмечая изменения в структуре мономеров, при которых произойдет переход в L-форму. Оказалось, что удлинение R-формы на 0,8 Å и переход в L-форму происходит благодаря изменению конформации β-шпильки в районе D1 домена флагеллина (район с 140 по 160 аминокислотный остаток в N-концевой области).

1. 4. Множественность флагеллиновых генов у бактерий

Среди бактерий, аннотированных как имеющие систему жгутиковой подвижности, около 45% содержат в геноме несколько копий флагеллиновых генов, что указывает на селективные преимущества множественности флагеллиновых генов (Faulds-Pain et al., 2011). Количество генов флагеллинов у таких организмов варьирует от 2 (*Salmonella enterica*, серовар Typhimurium) до 15 (*Magnetococcus* sp. MC-1).

Исследования, проведенные на *S. Typhimurium*, имеющей два гена флагеллина, показали, что жгутик данного организма может строиться из продукта одного или другого гена. За смену белкового состава жгутика отвечает система фазовой вариации (Silverman et al., 1979), состоящая из генов основного и дополнительного флагеллинов (*fliC* и *fljB*), гена белка-репрессора транскрипции, гена основного флагеллина и гена инвертазы, контролирующей фазовую вариацию флагеллинов. Рекомбинационный механизм (сайт-специфическая инверсия сегмента, содержащего промотор) обеспечивает экспрессию только одного или другого флагеллина в каждый момент времени. Ген *fljB* находится в одном опероне с геном репрессора транскрипции гена *fliC*. Таким образом, в разных фазах жгутик *S. Typhimurium* состоит из разных флагеллинов, что помогает данному патогенному организму избегать иммунного ответа хозяина за счет смены антигенных детерминант.

Геном другого организма, обладающего множественностью флагеллиновых генов, *Caulobacter crescentus* имеет 6 флагеллиновых генов (*fljK, L, M, N, O, J*), причем белковые продукты каждого из генов содержатся в жгутиках дикого типа. Интересно, что различные части филамента клеток дикого типа состоят из разных флагеллинов. С помощью делеционного анализа было показано, что каждый из флагеллинов, кроме FljJ, может в одиночку строить функциональный филамент. Кроме того, было обнаружено, что нет строгих требований к порядку включения флагеллинов в растущий жгутик, и наблюдаемое распределение флагеллинов вдоль филамента скорее отражает регуляцию секреции флагеллинов (Faulds-Pain et

al., 2011). Таким образом, данный организм имеет высокую избыточность по генам флагеллинов, смысл которой на данный момент остается непонятным.

2. Краткая характеристика бактериальных пилей IV-го типа

2. 1. Общие сведения

Пили IV-го типа представляют собой гибкие нити на поверхности как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, которые опосредуют такие функции как адгезию, подвижность, передачу сигналов, уход от иммунного ответа, захват ДНК (компетентность), образование микроколоний и секрецию факторов колонизации. Морфологически пили выглядят как протяженные нити, имеющие 6-9 нм в диаметре и несколько микрометров в длину (рисунок 4). Данные структуры являются гомополимерами, состоящими из субъединиц белка – пилина. Молекулярная масса пилинов составляет 15-20 кДа. Отдельные пили способны латерально агрегировать друг с другом, что приводит к образованию пучков (Craig and Li, 2008).

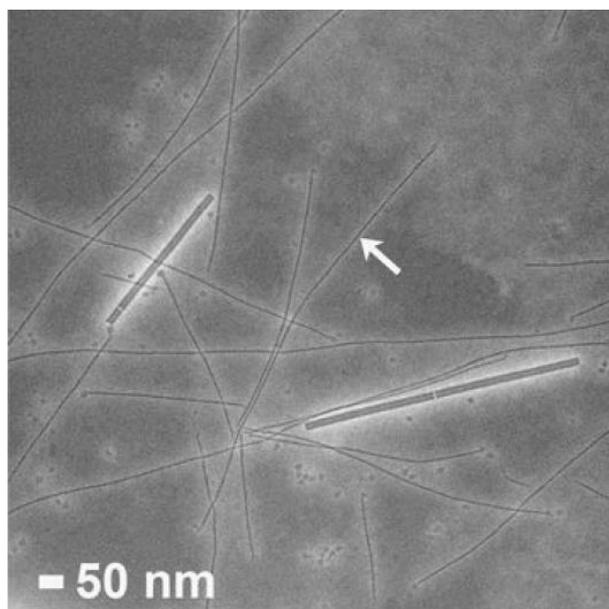
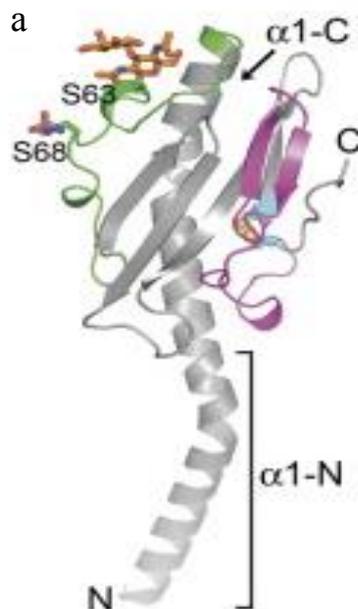


Рисунок 4. Пили *Neisseria gonorrhoeae* (отмечены стрелкой). Так же присутствуют частицы вируса табачной мозаики (диаметр 18 Å). Рисунок взят из (Craig and Li, 2008).

В сборке пилей IV-го типа участвует большое количество белков (12 и более), которые во многих случаях кодируются одним опероном. Для данных белков характерна консервативность у разных видов бактерий. Некоторые ключевые компоненты системы пилей IV-го типа имеются во всех бактериальных системах пилей данного типа, они включают в себя: 1) субъединицу мажорного пилина; 2) специфическую препилиновую пептидазу внутренней мембраны, удаляющую N-концевой сигнальный пептид; 3) специфическую АТФазу, снабжающую энергией процесс сборки пилей; 4) интегральный белок внутренней мембраны, рекрутирующий АТФазу из цитоплазмы; 5) интегральный секретин внешней мембраны, необходимый для выхода пилей IV-го типа на поверхность клетки. Интересно, что некоторые из данных белков имеют гомологию с компонентами системы секреции II-го типа и системы жгутиковой подвижности архей, что указывает на то, что данные структуры имеют общее происхождение и являются вариациями системы транспорта макромолекул (Vardy et al., 2003a; Craig et al., 2004; Johnson et al., 2006).

Структурным компонентом пилей IV-го типа являются белки - пилины, общие свойства которых: 1) гомологичный и очень гидрофобный N-конец (~25 остатков); 2) N-метилованный N-концевой остаток; 3) пара цистеинов в области C-конца (Strom and Lory, 1993). На данный момент, с помощью рентгеноструктурного анализа решены структуры двух полноразмерных пилинов, кроме того, с помощью метода ЯМР решены структуры нескольких укороченных форм пилинов, лишенных N-концевого гидрофобного участка (Hansen and Forest, 2006). Несмотря на низкую гомологию аминокислотной последовательности за пределами первых 25 остатков, все пилины IV-го типа имеют общую архитектуру (рисунок 5): примерно 53 N-концевые аминокислоты формируют протяженную α -спираль – $\alpha 1$, N-концевая половина данной спирали выдается из белка, а C-концевая половина – $\alpha 1$ -C, входит в глобулярный домен и взаимодействует с антипараллельным β -листом. При этом консервативные цистеины образуют дисульфидную связь, связывающую C-концевой сегмент с β -листом. По обе

стороны от данного консервативного участка расположены два региона, существенно отличающиеся у разных пилинов: $\alpha\beta$ -петля, расположенная между $\alpha 1$ и β -листом; и D-регион, ограниченный двумя цистеинами.



б

Сигнальный пептид	α1		αβ-петля	β-лист	Cys	D-регион	Cys	С-конец
	α1-N	α1-C						

Рисунок 5. Структура и схематическое изображение пилина *N. gonorrhoeae*: а) Структура полноразмерного пилина с разрешением 2,3 Å. Рисунок взят из (Craig and Li, 2008); б) Схематическое изображение пилина, показывающее различные его участки (цвета соответствуют цветам на рисунке 5а).

Пилины из различных организмов имеют одинаковую модульную структуру, позволяющую им собираться в филамент пилия, используя одинаковый архитектурный план. Консервативный структурный остов удерживает субъединицы вместе в составе филамента, а $\alpha\beta$ -петля и D-регион определяют форму и химические свойства поверхности и, следовательно, функции пилия. Первая модель пилия IV-типа была предложена, исходя из структуры пилина (Parge et al., 1995). Согласно данной модели гидрофобные $\alpha 1$ -спирали закручены в

спиральную периодическую структуру, формируя коровую часть филамента, заякоривая глобулярные домены, образующие внешнюю поверхность. С появлением новых структурных данных эта модель претерпела некоторые изменения, но ее ключевые свойства оказались верными.

2. 2. Ультраструктура пилей IV-го типа

Структура пили IV-го типа гонококков была установлена путем встраивания структуры полноразмерного пилина в реконструкцию филамента, построенную на основе данных криоэлектронной микроскопии с разрешением 12,5 Å (Craig et al., 2006) и представлена на рисунке 6.

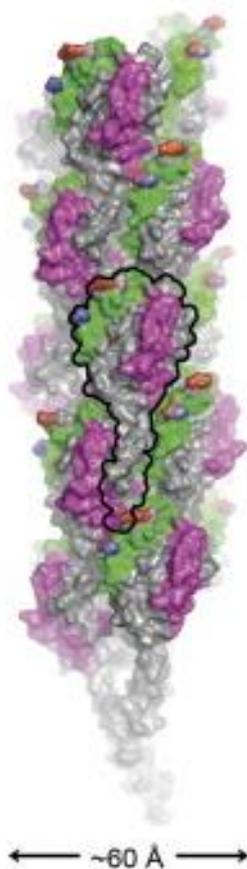


Рисунок 6. Реконструкция GC-пиля *N. gonorrhoeae*, полученная на основе данных криоэлектронной микроскопии с разрешением 12,5 Å. Цвета соответствуют цветам, приведенным на рисунке 5. Рисунок взят из (Craig and Li, 2008).

Из данной модели видно, что структура филамента удерживается за счет гидрофобных взаимодействий между N-концевыми α -спиралями в ядре филамента, при этом глобулярные домены свободно упакованы на поверхности филамента. Такая упаковка приводит к высокой гофрированности поверхности филамента с желобками, проходящими между глобулярными доменами. Некоторые из этих желобков облицованы положительно заряженными остатками, что может объяснять роль пилей в захвате ДНК из внешней среды. ДНК в таких желобках может связываться неспецифично за счет отрицательно заряженного сахарофосфатного остова нуклеиновой кислоты и проникать внутрь клетки при втягивания пилия. Поверхность глобулярных доменов отвечает за свойства, важные для функций пилия: $\alpha\beta$ -петля образует выступ на поверхности субъединицы, имеющий посттрансляционные модификации; D-область образует второй выступ, несущий “гипервариабельную петлю” - область с крайне высокой вариабельностью аминокислотной последовательности у пилинов гонококков и менингококков. Данная область экспонирована на поверхность филамента и, возможно, ее гипервариабельность объясняет способность данных микроорганизмов уходить от иммунного ответа хозяина и вызывать хроническое протекание заболевания.

2. 3. Сборка пилей IV-го типа

В отличие от успехов, достигнутых в изучении структуры пилей IV-го типа, механизм, с помощью которого данные филаменты собираются, остается до сих пор малоизученным. Согласно современным представлениям, субъединицы пилина синтезируются в цитозоле и транспортируются через внутреннюю мембрану посредством Sec-пути. Данные субъединицы остаются заякоренными во внутренней мембране за счет своего $\alpha 1$ -N участка. Затем специальная трансмембранная препилиновая пептидаза удаляет N-концевую лидерную последовательность с цитоплазматической стороны субъединицы и добавляет метильную группу на N-концевой остаток (Kaufman et al., 1993; Strom et al., 1993;

Freitag et al., 1995). После чего глобулярный домен сворачивается в периплазме и образуется дисульфидная связь, формирование которой катализируется ферментом оксидоредуктазой (Peek and Taylor, 1992).

На данный момент мало что известно о процессе, с помощью которого субъединицы пилина переносятся из внутренней мембраны в состав растущего филамента. Известно, что полимеризация требует гидролиза АТФ цитозольной гексамерной АТФазой, которая привлекается к цитоплазматической стороне внутренней мембраны интегральным мембранным белком (Crowther et al., 2004; Tripathi and Taylor, 2007). На основании экспериментальных данных была предложена модель сборки пилей IV-го типа (Craig and Li, 2008). Согласно данной модели субъединицы пилина удерживаются во внутренней мембране за счет своих гидрофобных N-концевых α -спиралей. Они притягиваются к растущему филаменту частично за счет взаимодействия консервативного отрицательно заряженного глутамина-5 боковой цепи и положительно заряженного N-концевого остатка концевой субъединицы. Дополнительные взаимодействия между отдельными областями глобулярных доменов или глобулярным доменом и N-концевой α -спиралью, как было показано для *V. cholerae* (Li et al., 2008) так же могут помогать встраиванию субъединицы пилина в состав полимера. При включении субъединицы в растущий филамент он немного выдвигается в периплазму за счет механической силы, создаваемой при гидролизе одной молекулы АТФ на субъединице гексамерной АТФазы (PilB), расположенной с цитоплазматической стороны мембраны. Субъединицы включаются в состав растущего филамента по одной, но в трех разных сайтах, соответствующих каждому тяжу 3-х заходовой спирали. Небольшое выдвигание филамента, возникающее при добавлении субъединицы пилина, по-видимому создает брешь в следующем тяже 3-заходовой спирали, что позволяет встраивание следующей субъединицы пилина в филамент. Такой механизм позволяет субъединицам пилина быстро и последовательно встраиваться в состав растущего филамента (рисунок 7). По мере роста филамента он должен проникать через периплазму,

включая пептидогликановый слой и сквозь внешнюю мембрану. Для облегчения правильного встраивания филамента в пору внешней мембраны белки, участвующие в сборке пилия, вероятно, образуют большой динамический комплекс проходящий через периплазму и соединяющий внутреннюю и внешнюю мембраны.

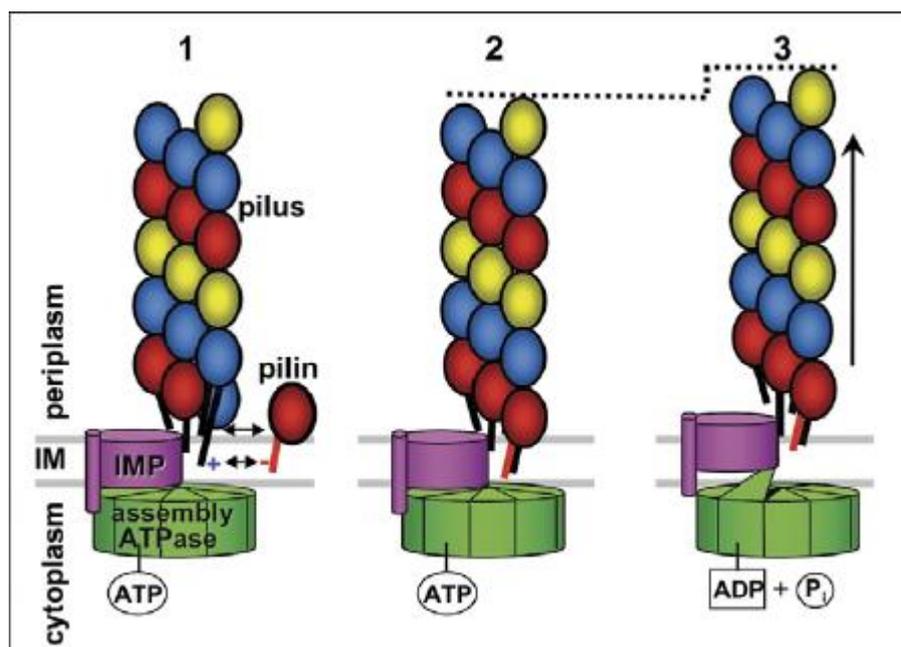


Рисунок 7. Модель сборки пилия IV типа. Cytoplasm – цитоплазма; periplasm – периплазма; IM – внутренняя мембрана; pilin – пилин; pilus – пиль; assembly ATPase – собирающая АТФаза. Рисунок взят из (Craig and Li., 2008).

Интересно, что пили IV-го типа способны и к обратному - втягиванию, данный процесс протекает за счет экстракции пилинов из состава филамента за счет конформационных изменений в белке PilT, опосредованном гидролизом АТФ. За счет этого бактериальные клетки способны к особому типу подвижности (так называемой “twitching motility”), при которой клетка пилем прикрепляется к субстрату, а затем, за счет деполимеризации пилия, сближается с ним.

3. Жгутиковая подвижность Архей

3. 1. Общая характеристика

Жгутики архей имеют некоторые общие черты как со жгутиками, так и пиллями бактерий. На данный момент в домене Архей описана подвижность только с использованием жгутиков (рисунок 8), которые, как и у бактерий, выполняют функцию гребного винта, создавая гидродинамическое усилие (Alam and Oesterhelt, 1984).

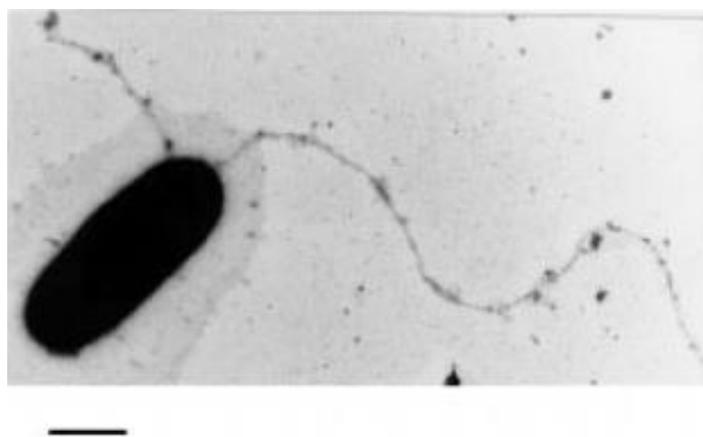


Рисунок 8. Электронно-микроскопическая фотография клетки *H. salinarum* со жгутиками. Масштабная линейка 500 нм. Рисунок взят из (Tarasov et al., 2000).

Изначально полагали, что аппарат жгутиковой подвижности архей идентичен аппарату жгутиковой подвижности бактерий, однако детальные исследования выявили между ними ряд фундаментальных отличий. Так, в ходе изучения, было показано, что: 1) жгутики архей существенно тоньше бактериальных и у них отсутствует внутренний канал, что указывает на принципиально иной механизм сборки; 2) компоненты аппарата жгутиковой подвижности архей не имеют гомологии с компонентами системы жгутиковой подвижности бактерий, но имеют гомологии с некоторыми компонентами системы бактериальных пилей IV-го типа; 3) основной структурный белок жгутика архей – флагеллин синтезируется в виде белка-предшественника с N-

концевым сигнальным пептидом. На сегодняшний день очевидно, что бактериальные и архейные жгутики являются функциональными аналогами, но имеют различное происхождение и являются одним из примеров биологической конвергенции. При этом жгутики архей проявляют множество общих свойств с бактериальными пиллями IV-го типа и, по всей видимости, имеют с ними общее происхождение. На основании этих и других фактов, был сделан вывод о том, что жгутики архей являются уникальным аппаратом биологической подвижности и в недавней работе для них был предложен термин “архелла” (archaella, от archaea и flagella) (Jarrell and Albers, 2012), который пока не стал общепринятым (Wirth, 2012).

Расположение архейных жгутиков на поверхности клетки может быть монополярным, биполярным или перитрихиальным. Собственно, филамент жгутика представляет собой нить толщиной 10-14 нм и длиной в несколько микрометров. В отличие от бактериальных жгутиков, у которых филамент может быть как право- так и левозакрученным, у архей на данный момент описаны только правозакрученные нити. Скорость движения архейных клеток варьирует в очень широких пределах - от 3 мкм/с для галофильных архей до ~600 мкм/с для некоторых представителей метаногенов. Интересен тот факт, что если рассматривать скорость движения организмов относительно их линейных размеров, то один из представителей метаногенов, а именно *Methanocaldococcus villosus*, в настоящий момент является рекордсменом по скорости среди всех известных организмов (500 длин тела в секунду) (Herzog and Wirth, 2012).

Кроме своей основной роли в обеспечении подвижности, архейные жгутики могут опосредовать такие функции как адгезию к абиотическим поверхностям, образование межклеточных контактов и, возможно, межклеточную коммуникацию (Nather et al., 2006; Jarrell et al., 2013).

3. 2. Организация генов аппарата подвижности Архей

У Архей большая часть генов, кодирующих белки аппарата подвижности, находится в области так называемого *fla*-локуса. Данный локус, как правило, начинается с одной или нескольких копий гена основного структурного компонента жгутика – флагеллина (FlaB на рисунке 9). Гены флагеллинов могут транскрибироваться как отдельно, так и совместно с лежащими ниже *fla*-ассоциированными генами. В целом, для архей характерно наличие нескольких копий генов флагеллинов в геноме, которые в свою очередь могут быть организованы в один или несколько оперонов. При этом часть генов флагеллинов может располагаться на удалении от *fla*-локуса (*H. salinarum*) и даже на других репликонах (*Haloarcula marismortui*).

Кроме генов флагеллинов в области *fla*-локуса располагается набор так называемых *fla*-ассоциированных генов, которые транскрибируются совместно. Эксперименты по делеции данных генов показали, что каждый из них является критически необходимым для подвижности (Patenge et al., 2001; Chaban et al., 2007; Lassak et al., 2012). У эври- и креноархей (царства Архей) набор генов данного кластера несколько отличается (рисунок 9).

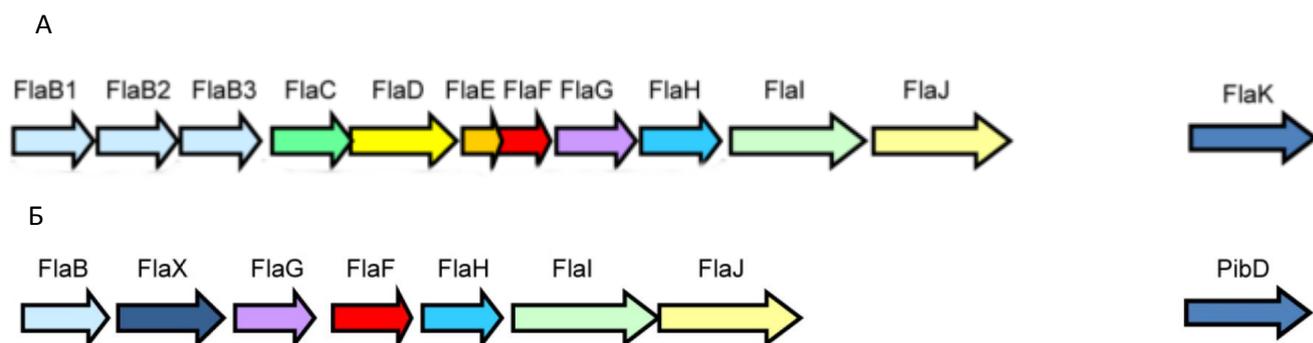


Рисунок 9. Структура *fla*-оперона на примере: А) *Methanococcus maripaludis* (Эвриархея); Б) *Sulfolobus acidocaldarius* (Креноархея). Так же показан ген сигнальной пептидазы, как правило, располагающийся за пределами данного локуса (FlaK и PibD). Рисунок взят из (Jarrell et al., 2013) с изменениями.

Гены *flaC* и *flaE* могут быть как отдельными, так и слитыми вместе (*H.*

salinarum), продукты данных генов являются мембранными белками. На *H. salinarum* было показано, что продукты гена *flaCE* и гена *flaD* могут взаимодействовать с компонентами системы хемотаксиса, и таким образом участвовать в переключении направления вращения мотора (Shlesner et al., 2009). У креноархей гены *flaC,D,E* отсутствуют, но присутствует ген *flaX*, отсутствующий у эвриархей. Теоретический анализ белка FlaX показал наличие гомологии с метил-акцептирующими белками, что может указывать на его возможную роль в передаче сигналов (Ghosh and Albers, 2011). В недавней работе было показано, что белок FlaX способен формировать олигомерную кольцеобразную структуру за счет С-концевых α -спиралей (Banerjee et al., 2012). Кроме того, он образует стабильный комплекс с белком FlaI и, возможно, участвует в генерации вращательного момента мотором архейного жгутика. Относительно функций продуктов генов *flaF* и *flaG* на данный момент мало что известно.

Продукты генов *flaH,I*, и *J*, как полагают, образуют секреторный комплекс, участвующий в сборке жгутика. Теоретический анализ белка FlaH показал, что он имеет в своем составе типичный Walker A мотив, но неполный Walker B мотив, что может говорить о его возможной АТФазной активности. В структуре белка FlaJ предсказывается от 7 до 9 трансмембранных участков, что указывает на то, что он является интегральным мембранным белком. Кроме того, в его структуре присутствуют 2 высоко заряженные цитоплазматические петли (Thomas and Jarrell, 2001; Ghosh and Albers, 2011). Данный белок является гомологом консервативного мембранного белка PilC системы пилей IV-го типа *Pseudomonas aeruginosa* и, вероятно, непосредственно взаимодействует с белком FlaI (Ghosh and Albers, 2011). Последний белок является АТФазой из суперсемейства секретирующих АТФаз, для которого была показана АТФазная активность *in vitro*, причем данная активность стимулировалась в присутствии липидов архейной мембраны. Предполагается, что данный белок снабжает энергией систему сборки жгутика (Ghosh et al., 2011).

Еще одним компонентом системы подвижности является расположенная в мембране сигнальная (лидерная) пептидаза (FlaK или PibD), ген которой располагается на удалении от *fla*-локуса. Роль сигнальной пептидазы сводится к отщеплению сигнального пептида от молекулы флагеллина, который синтезируется в виде белка-предшественника с сигнальным пептидом, схожим с таковым у пилинов IV-го типа (Kalmokoff and Jarrell, 1991; Bardy and Jarrell, 2002; Bardy and Jarrell, 2003; Szabo et al., 2006). Длина сигнального пептида у флагеллинов варьирует в диапазоне 6-16 аминокислотных остатков (Ng et al., 2006). Генетические исследования показали, что удаление сигнального пептида является критически важным шагом в формировании аппарата подвижности (Bardy and Jarrell, 2003; Tripepi et al., 2010). Наиболее детально исследовались сигнальные пептидазы FlaK из *M. voltae* и *M. maripaludis* (Bardy and Jarrell, 2002; Bardy and Jarrell, 2003; Hu et al., 2011), а также PibD из *Sulfolobus solfataricus* (Albers et al., 2003; Szabo et al., 2006). Эксперименты, по сайт-направленному мутагенезу, позволили установить остатки, которые определяют сайт, по которому работает данная протеаза. Так было показано, что наиболее важным компонентом является глицин (у некоторых архей замененный на аланин или серин) в положении -1 (точкой расщепления является позиция +1), кроме этого важную роль играют основные аминокислоты в положениях -2, -3 и консервативный глицин в положении +3 (Thomas et al., 2001; Ng et al., 2006).

3. 3. Регуляция сборки аппарата жгутиковой подвижности Архей

В разделе, посвященном жгутиковой подвижности бактерий, упоминалось, что сборка и функционирование жгутика является крайне энергозатратным процессом для клетки, поэтому жгутикование находится под строгим контролем регуляторных механизмов. Данное утверждение справедливо и для архей. Первым примером влияния условий внешней среды на синтез жгутиков у архей стало обнаружение того факта, что у *Methanocaldococcus jannaschii* и *Methanococcus*

maripaludis происходит индукция синтеза жгутиков в условиях низкой концентрации водорода (Mukhopadnaya et al., 2000; Hendrickson et al., 2008). Надо сказать, что данные организмы являются метаногенами и используют молекулярный водород как донор электронов в процессе метаногенеза, являющимся для них источником энергии. Из этого был сделан вывод, что голодание является фактором, вызывающим синтез жгутиков. Схожий эффект был затем обнаружен на другом археоне - *Sulfolobus solfataricus*, у которого уровень транскрипции гена флагеллина сильно возрастал при достижении стационарной фазы роста или же в условиях голодания по азоту (Szabo et al., 2007).

Изучение *fla*-оперона другого археона - *S. acidocaldarius*, показало наличие двух промоторов (Lassak et al., 2012). Один промотор находился перед геном флагеллина (*flaB*), а второй перед геном *flaX*, с которого шла транскрипция генов *flaX-J* (рисунок 7). Для данного организма, как и для родственного *S. solfataricus*, было обнаружено явление индукции синтеза жгутиков в условиях голодания. Эксперименты по количественной ПЦР (полимеразная цепная реакция) показали, что в данных условиях идет сильная активация промотора, находящегося перед геном флагеллина, в то же время, второй промотор не показывал такого эффекта. Данные результаты указывают на то, что у *S. acidocaldarius* гены белков базального тела находятся под контролем конститутивного промотора (находится перед геном *flaX*) и таким образом продукты данных генов постоянно присутствуют в клетке. Следовательно, для того чтобы клетка начала активно двигаться необходим только синтез флагеллина, ген которого находится под индуцибельным промотором, активируемым в условиях голодания. Такая система регуляции позволяет клетке быстро достроить аппарат подвижности и начать поиск более благоприятных условий. Дальнейшие исследования данной системы позволили идентифицировать ряд белков, регулирующих биосинтез аппарата подвижности (Reimann et al., 2012; Lassak et al., 2013).

3. 4. Исследование структуры жгутика Архей

На данный момент строение аппарата жгутиковой подвижности Архей, в сравнении с бактериальным аналогом, изучено крайне слабо. В разделе, посвященном бактериям было сказано, что бактериальный жгутик состоит из жесткого филамента, выполняющего роль гребного винта, мотора, создающего вращательное движение, и гибкого сочленения – крюка, передающего вращательный момент с мотора на филамент. У архей были обнаружены аналогичные структуры, хотя крюк идентифицирован только у метаногенов. Данная область выглядит как утолщение нити вблизи конца жгутика при электронной микроскопии с негативным контрастированием уранилацетатом. Использование фосфовольфрамовой кислоты позволило обнаружить область крюка у *Methanococcus voltae*, в 2 раза превосходящую по длине крюк бактерий (Thomas et al., 2001б).

Базальные тела у архей были обнаружены при помощи электронной микроскопии образцов клеток и мембранных фракций, подвергнутых обработке неионным детергентом Triton X-114. Были описаны структуры, представляющие собой (у *Methanospirillum hungatei* (Kalmokoff et al., 1988) и у *M. thermolithotrophicus* (Cruden et al., 1989)) пару колец, соединенных стержнем, сходные с таковыми у грамположительных бактерий. Кроме того, при работе с *H. salinarum* удалось получить пучок жгутиков, прикрепленный к полярной кэп-структуре (Kupper et al., 1994). На срезах клеток ей соответствовала дисковидная пластинчатая структура (ДПС) (Бакеева и др., 1992). Было обнаружено, что пучок жгутиков проходит сквозь цитоплазматическую мембрану и упирается в сложную электронноплотную структуру длиной 250-300 нм расположенную на расстоянии 20 нм от мембраны (Метлина, 2001; 2004). Предполагается, что по причине иного строения клеточной стенки у архей, необходимо наличие дополнительных структур, удерживающих жгутик. На данный момент точная структура и механизм функционирования мотора, создающего вращательное движение, остаются неизвестными. Для *H. salinarum* было показано, что вращение архейного мотора

идет за счет энергии АТФ, в отличие от бактериального мотора, использующего энергию градиента протонов или ионов натрия (Streif et al., 2008).

В настоящее время идет активное изучение белков базального тела на модельном организме *Sulfolobus acidocaldarius*. В недавней работе было показано, что белок FlaI *in vitro* обладает АТФазной активностью, причем данная активность специфично стимулировалась при добавлении липидов архейной мембраны (Ghosh et al., 2011). Кроме того, была обнаружена АТФ-зависимая олигомеризация данного белка с образованием гексамера диаметром 14 нм (Reindl et al., 2013). Проведенные исследования позволили сделать вывод о том, что именно белок FlaI отвечает за сборку и вращение филамента жгутика. Изучение другого компонента базального тела – белка FlaX, показало, что белок FlaXc (укороченный вариант белка FlaX) способен образовывать олигомерные кольца диаметром 30 нм *in vitro*. Кроме того, было обнаружено, что белок FlaX взаимодействует с белком FlaI за счет своего С-концевого региона (Banerjee et al., 2012). Дальнейшие эксперименты показали способность белков FlaXc, FlaI и FlaH взаимодействовать друг с другом с образованием тройного комплекса (Banerjee et al., 2013). На основании этих данных была предложена модель базального тела (рисунок 10). Согласно данной модели в качестве платформы для сборки мотора выступает политопный трансмембранный белок FlaJ, вокруг которого белок FlaX образует олигомерное кольцо диаметром 30 нм. Затем в данное кольцо входит гексамер, состоящий из белка FlaI, при этом данный гексамер способен образовывать дополнительные связи с белком FlaJ. С этим комплексом дополнительно может связываться белок FlaH, выполняющий, по-видимому, функции связывания нуклеотидов и регуляции подвижности.

Основную часть жгутика составляет спиральный филамент, состоящий из множества копий одного или нескольких флагеллинов. Типичная толщина архейного филамента составляет 10-14 нм, длина - несколько микрометров. На основании электронно-микроскопических фотографий были построены реконструкции филаментов *H. salinarum* и *Sulfolobus shibatae* (Cohen-Krausz and

Trachtenberg, 2002; Trachtenberg et al., 2005; Cohen-Krausz and Trachtenberg, 2008). Несмотря на то, что жгутики *S. shibatae* построены из одного флагеллина, а жгутики *H. salinarum* из 5 они имеют общий план строения. Внешний домен представляет собой трехзаходную спираль, намотанную вокруг коровой части, в которой отсутствует внутренний канал. Внутренний кор консервативен по форме и размеру у обоих организмов и имеет толщину около 5 нм. Данный кор, по-видимому, образован гидрофобными α -спиралями N-концевых частей флагеллинов. Так как флагеллины архей имеют высококонсервативную область в 30-40 аминокислот на N-конце (Kalmokoff et al., 1990; Kalmokoff and Jarrell, 1991; Vardy et al., 2003б), предполагается, что такая структура коровой области является общей для всего домена Архей. В отличие от консервативного внутреннего домена, внешняя часть филамента у данных организмов отличается, что и приводит к различию в толщинах жгутиков – 14 нм у *Sulfolobus shibatae* и 10 нм у *H. salinarum*. Отличия в данной области, по-видимому, отражают адаптацию организмов к специфическим условиям обитания (Cohen-Krausz and Trachtenberg, 2002; Cohen-Krausz and Trachtenberg, 2008).

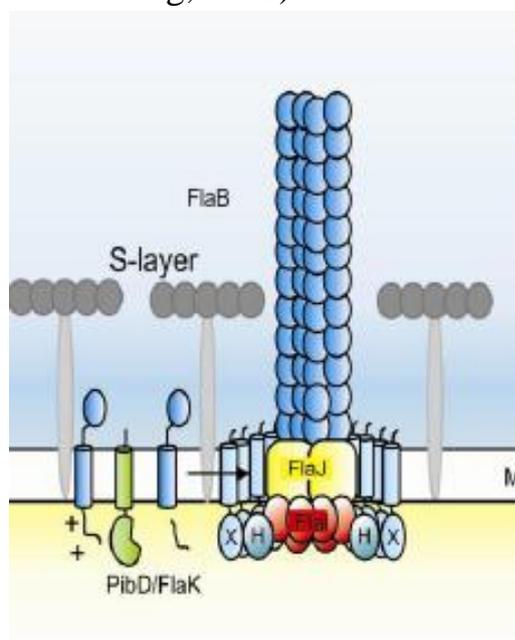


Рисунок 10. Схематичное изображение строения жгутика архей на примере *S. acidocaldarius*. М – мембрана; S-layer – S-слой. Рисунок взят из (Shahapure et al., 2014).

Надо отметить, что жгутики архей довольно устойчивы к диссоциирующим воздействиям и, в отличие от бактериальных, не способны к самосборке из отдельных субъединиц *in vitro*. Кроме того, в настоящее время нет ни одной решенной структуры флагеллинов архей. Для получения информации о доменной структуре флагелинов архей был использован метод сканирующей микрокалориметрии. Так, с помощью данного метода в нашей группе проводилось исследование жгутиков *H. salinarum*. Данные эксперименты показали наличие единственного пика теплопоглощения, соответствующего кооперативному плавлению доменов, что говорит о том, что все пять флагеллинов данного организма имеют схожие термодинамические характеристики (Tarasov et al., 1995). Плавление доменов при этом не приводило к диссоциации нити жгутика. Данные результаты удалось получить только при проведении измерений в буфере с пониженной концентрацией NaCl (10% и ниже), при работе с более высокими концентрациями соли (20% NaCl) пик теплопоглощения не попадал в сканируемую область (до 130 °C), что говорит о высокой термостабильности жгутиков данного организма. Интересные результаты так же были получены для флагеллинов *Natronomonas pharaonis* (Пятибратов и др., 1996). Жгутики данного организма удавалось подвергнуть деполимеризации до отдельных субъединиц в присутствии неионного детергента Тритон X-100, при этом флагеллины сохраняли третичную структуру и плавилась кооперативно. Надо сказать, что при этом кривые плавления мономерных флагеллинов и жгутиков отличались по форме, что, видимо, связано с дестабилизацией третичной структуры флагеллинов после диссоциации. Данные результаты свидетельствовали о важной роли гидрофобных взаимодействий в формировании структуры жгутика. Как в случае жгутиков *H. salinarum*, так и *N. pharaonis* плавление доменов носило необратимый характер – повторное прогревание образцов не выявило процессов ренатурации.

3. 5. Гликозилирование белков у Архей

Организмы, принадлежащие к различным доменам живой природы, имеют как черты общие для всех, так и уникальные для каждой группы. Долгое время считалось, что отличительной чертой эукариот является способность к N-гликозилированию белков (Calo et al., 2010). Данное представление, однако, было опровергнуто открытием того факта, что белок поверхностного S-слоя галофильного археона *H. salinarum* так же подвергается гликозилированию по N-типу (Mescher and Strominger, 1976). Дальнейшие исследования позволили установить, что данный случай не является уникальным и гликозилирование широко распространено среди архей (Calo et al., 2010). Исследование гликозилирования белков у галофильных архей проводилось в основном на гликопротеине S-слоя *Haloferox volcanii*, на котором в частности было показано, что он гликозилирован не только по N-, но и по O-типу (в области богатой треонинами) (Mescher and Strominger, 1976; Sumper et al., 1990).

Для установления роли гликозилирования проводились эксперименты по его нарушению, которые показали, что N-гликозилирование не является жизненно необходимым для архей, как минимум в протестированных условиях (Triperri et al., 2012). В настоящее время считается, что данная посттрансляционная модификация позволяет белкам функционировать в суровых условиях окружающей среды, в которых зачастую обитают археи (Calo et al., 2010). В этой связи интересно так же отметить, что количество сайтов, по которым проходит N-гликозилирование, а также структура присоединяемого гликана может меняться при изменении условий культивирования (Guan et al., 2012). Данные результаты могут указывать на возможную роль N-гликозилирования в адаптации к меняющимся условиям окружающей среды.

Кроме белка S-слоя, гликозилированию у архей так же подвергается структурный белок нити жгутика – флагеллин. Все флагеллины *M. voltae*, *M. maripaludis* и *Hfx. volcanii* являются гликопротеинами с N-типом гликозилирования (Wieland et al., 1985; Sumper et al., 1987; Voisin et al., 2005; Kelly

et al., 2009; Triperí et al., 2012). Данный тип гликозилирования представляет собой многоступенчатый процесс, модель которого была предложена на основе изучения гликозилирования флагеллинов видов *Methanococcus* (Jarrell et al., 2013). На первом этапе в цитоплазме на липидном переносчике собирается N-гликан путем последовательного добавления углеводных мономеров соответствующими гликозилтрансферазами. Затем данный гликан переносится через цитоплазматическую мембрану посредством пока неизвестного фермента. После чего N-гликан целиком переносится на остаток аспарагина молекулы флагеллина, входящий в сайт гликозилирования (N-X-S/T, где X-любая аминокислота кроме пролина), посредством олигосахарилтрансферазы AglB (Chaban et al., 2006; Vandyke et al., 2009). Длина и строение присоединяемого гликана у разных видов может отличаться.

Анализ мутантных штаммов, с делециями по генам *agl* (кодируют белки системы гликозилирования), которые приводили к укорочению цепей гликана, показал, что негликозилированные флагеллины и флагеллины, несущие гликаны, состоящие только из одного сахара, не формируют жгутики, как было показано на *M. voltae* и *M. maripaludis* (Chaban et al., 2006; Vandyke et al., 2009). В случаях, когда гликаны состояли из 2-3 сахаров, клетки имели жгутики, но их подвижность на полужидкой среде была снижена, в сравнении с клетками дикого типа, несущими углеводные цепи нормальной длины (состоящие из 4-х мономеров).

Кроме того, флагеллины архей могут иметь в своем составе по несколько сайтов для N-гликозилирования, так, например, флагеллин FlgA1 *Hfx. volcanii* (мажорный флагеллин) содержит три сайта. С помощью сайт-направленного мутагенеза, было показано, что все три сайта важны для сборки или функционирования жгутика, так как нарушение каждого из сайтов приводило к утрате подвижности на полужидкой среде (Triperí et al., 2012). Таким образом, все имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на то, что N-гликозилирование является посттрансляционной модификацией, критически важной для правильной сборки архейного жгутика. В настоящее время

неизвестен точный механизм, за счет которого гликозилирование необходимо для нормальной клеточной подвижности, однако есть данные, что эта посттрансляционная модификация влияет на устойчивость жгутиков к воздействию диссоциирующих агентов, а также важна для правильного закрепления жгутика в цитоплазматической мембране (Thomas et al., 2001b; Calo et al., 2010).

3. 6. Эксперименты по инактивации генов флагеллинов

Количество флагеллиновых генов у Архей варьирует в широких пределах, при этом множественность флагеллиновых генов распространена гораздо шире, чем у бактерий. Ранние исследования аппарата подвижности архей показали присутствие нескольких флагелинов в составе жгутиков. С целью определения роли каждого из флагеллинов в формировании филамента были проведены эксперименты по инактивации соответствующих генов на ограниченном круге модельных организмов. Эксперименты по инактивации проводились как с помощью вставок, так и с помощью делеций. Среди галофильных архей для данных экспериментов был выбран галофильный археон *H. salinarum*. Геном данного организма содержит 6 флагеллиновых генов (*flgA1*, *A2* образуют А-оперон, *flgB1*, *B2*, *B3* образуют В-оперон, кроме них присутствует ген *flgX*), причем в составе жгутиков обнаружены продукты только первых пяти (Gerl et al., 1989). Первые эксперименты по выяснению роли каждого из флагеллинов проводились с помощью инактивации вставкой; так инактивация *flgA2*-гена приводила к существенному снижению подвижности клеток, при этом формировались только прямые жгутики (Tarasov et al., 2000). Кроме того, было показано, что в клетках данного мутантного штамма прекращалась транскрипция *flgB*-оперона. Дальнейшие исследования проводились с помощью делеционного подхода, полученные результаты показали, что при делеции каждого из генов *flgA*-оперона, как и в случае с инактивацией, наблюдались лишь жгутики прямой формы (Тарасов и др., 2004). Как было рассмотрено в разделе, посвященном

подвижности бактерий, спирализация бактериального жгутика осуществляется за счет способности единственно флагеллина принимать два конформационных состояния – L или R. На основании экспериментов по инактивации генов флагеллинов *H. salinarum* было высказано предположение о том, что у данного организма FlgA1- и FlgA2-флагеллины могут являться аналогами двух конформационных состояний единственного флагеллина бактерий. Кроме того, было высказано предположение, что данный принцип надмолекулярной организации филаменты жгутиков может являться общим для архей, так как для другого археона *Natrialba magadii*, филаменты которого построены из четырех различных флагеллинов, было обнаружено два иммунологически различных типа протофиламентов (Pyatibratov et al., 2002).

С использованием делеции генов так же проводились исследования роли генов *flgB*-оперона *H. salinarum*. На поверхности клеток штамма с делецией A-оперона ($\Delta flgA$) наблюдались короткие изогнутые нити, состоящие из FlgB2-флагеллина. В то же время анализ мутантных штаммов, у которых присутствовал только *flgB1*- или *flgB3*-ген флагеллина показал, что на поверхности таких клеток изогнутые структуры отсутствовали, из чего был сделан вывод о том, что данные белки не могут брать на себя роль в формировании изогнутых структур в отсутствие FlgB2-флагеллина (Безносов и др., 2007). Из данных результатов было сделано предположение, что FlgB2-флагеллин формирует область крюка у *H. salinarum*. В недавней работе, однако, было показано, что FlgB2-флагеллин равномерно распределен по длине филамента, а не локализован вблизи основания жгутика, как можно было бы ожидать для белка крюка (Beznosov et al., 2013).

Роль множественности флагеллиновых генов изучалась так же на представителях метаногенных архей. В экспериментах было показано, что инактивация генов флагеллинов приводила или к полной потере или же к аномалиям в подвижности (Chaban et al., 2007). Общим выводом из данных экспериментов являлось то, что продукт каждого гена необходим для нормальной подвижности архей. Однако роль множественности по генам флагеллинов так и

осталась не ясной. В этой связи интересно отметить существование группы организмов рода Сульфолобус (царство Креноархей), стоящей несколько особняком. Представители данного рода имеют всего один ген флагеллина и при этом подвижны (Szabo et al., 2007; Lewus and Ford, 1999).

Выбор *Haloarcula marismortui*, в качестве объекта для изучения формирования жгутика, обусловлен следующими причинами: 1) два гена флагеллинов расположены на различных репликациях – хромосоме и плазмиде; 2) массы флагеллинов, вычисленные по нуклеотидным последовательностям, значительно превосходят массы флагеллинов других архей (Baliga et al., 2004). Эти факты позволяют предположить, что принципы построения жгутика и регуляции биосинтеза флагеллинов у данного организма могут быть отличными от таковых для аппаратов подвижности, ранее изученных архей.

4. Другие поверхностные структуры архей

4. 1. Краткая характеристика других поверхностных структур архей

Кроме жгутиков у представителей домена Архей обнаружен еще целый ряд поверхностных структур: пили, Pib670 фибриллы, канньюли, хами и биндосомы (Jarrell et al., 2013).

Пили. У архей пили были обнаружены достаточно давно с помощью электронной микроскопии, однако лишь недавно появились работы по изучению их структуры, функций и механизма сборки. Большинство исследований пилей проводится на организмах, легко поддающихся генетическим манипуляциям - представителях родов *Sulfolobus*, *Methanococcus* и *Haloferax*. Бактериальные пили задействованы во многих процессах, это справедливо и для пилей архей – они участвуют в адгезии, клеточной агрегации, образовании биопленок и обмене ДНК (Ajon et al., 2011; Frols et al., 2008). Все исследованные к настоящему времени пили относятся к пиям, подобным бактериальным пиям IV-го типа, за исключением Mth60 фимбрий *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Thoma et

al., 2008). Последние имеют толщину 5 нм и для них первыми было показано, что они могут участвовать в адгезии как к абиотическим поверхностям, так и к другим клеткам. К пиям, сходными с пиями IV-го типа, относят так называемые УФ-индуцируемые (Ups) пили, а также адгезивные (Aap) пили. Ups пили синтезируются клетками, подвергшимися ультрафиолетовому (УФ) облучению, было показано, что данные структуры участвуют в межклеточной агрегации, что, в свою очередь, способствует обмену ДНК между клетками и репарации ДНК по механизму гомологичной рекомбинации (Ajon et al., 2011).

Интересно так же отметить, что в недавних работах была показана связь между системой пилей и аппаратом жгутиковой подвижности архей (Esquivel and Pohlschroder, 2014). В настоящее время, однако, точный механизм данного взаимодействия остается неизвестным.

Ино67 фибриллы. Ино67 фибриллы были обнаружены у археона *Ignicoccus hospitalis*, они являются филаментами, участвующими в адгезии и название свое получили по названию их основного структурного белка, являющегося продуктом гена *Igni_0670* (Muller et al., 2009). Данные структуры имеют толщину 14 нм и длину до 20 мкм и состоят из единственного белка с молекулярной массой 33 кДа. Данный белок имеет гидрофобный N-конец с сигнальным пептидом как у пилей IV-типа, и не имеет гомологии со структурными белками других поверхностных структур архей. Структурный анализ показал, что кор филаментов образован α -спиралями, при этом общая спиральная симметрия схожа с таковой у жгутиков *H. salinarum* и *S. shibatae*, четвертичная структура их при этом, однако, уникальна (Yu et al., 2012).

Каннюли (Cannulae). Отличительной чертой видов, принадлежащих к роду *Pyrodictium* является то, что отдельные клетки растут в сети из внеклеточных трубочек, называемых каннюлями (Rieger et al., 1995). Данные структуры имеют внешний диаметр 25 нм и выглядят полыми на срезах. Характерной чертой каннюлей является их высокая устойчивость к нагреванию и денатурирующим условиям. Исследования показали, что каннюли проникают в периплазматическое

пространство, но не в цитоплазму соединяемых клеток (Nickell et al., 2003). В настоящее время остается неизвестным, могут ли ДНК и питательные вещества транспортироваться от одной клетки к другой посредством данной сети.

Хами. Данные структуры были выделены из некультивируемого эвриархеона SM1, обитающего в холодных (~10 °C) сульфидных источниках в составе архейно-бактериальных сообществ. Термин Хами (от латинского “hamus” - крюк) достаточно точно характеризует эти структуры. Они представляют из себя пилин-подобный филамент, диаметром 7-8 нм (без внутреннего канала) и длиной 1-3 мкм, на дистальном конце которого находится крюк с тремя “зубьями” (Moissl et al., 2005). Хами расположены перитрихально по всей поверхности клеток (около 100 на клетку) и обеспечивают прочную адгезию клеток к различным типам абиотических поверхностей, а также к бактериям-партнерам из их природного сообщества (Moissl-Eichinger and Huber, 2011).

Биндосомы. Биндосомы являются поверхностными структурами, обнаруженными на археоне *S. solfataricus*. Они включают в себя сахар-связывающие белки, работающие совместно с ABC-транспортёрами, и облегчают захват сахаров из окружающей среды (Albers et al., 1999; Elferink et al., 2001). Сахар-связывающие белки GlcS и AraS имеют сигнальный пептид (схожий с таковым у пилинов IV-го типа) и процессируются сигнальной пептидазой PibD (Albers et al., 2003). Вывод данных белков на поверхность клетки направляется системой сборки биндосомы, которая имеет общие черты с системой сборки бактериальных пилей IV-го типа. На основании данного сходства можно было ожидать, что данная структура будет иметь сходное строение с пиллями IV-го типа, однако биндосомы не были обнаружены на поверхности клеток в виде выростов. В настоящее время полагают, что биндосомы интегрированы в клеточную оболочку *S. solfataricus* (Pohlschroder et al., 2011) и являются важной функциональной частью S-слоя данного организма.

Однако на данный момент нет свидетельств об участии описанных структур в подвижности архей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

5. Материалы и методы исследования

5. 1. Химические реагенты и ферменты

В работе были использованы следующие химические реагенты и ферменты:

ТЕМЕД (N,N,N,N–тетраметилэтилендиамин), тритон X-100, триптон, пептон, бакто-агар, дрожжевой экстракт - “Helicon” (Россия);

ЭДТА (этилендиаминтетраацетат) – Диа-М;

β -меркаптоэтанол – “Serva” (Германия);

бромфеноловый синий - “Reanal” (Венгрия);

ПЭГ 6000 (полиэтиленгликоль 6000) – “Panreac” (Испания);

акриламид, метиленбисакриламид, персульфат аммония, кумасси G-250, ДСН (додецилсульфат натрия), ПЭГ 600, ДМСО (диметилсульфоксид), ампициллин, мевинолин, трипсин, пепсин, соевый ингибитор трипсина – “Sigma” (США);

V8-протеаза (эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8) – “Roche Applied Science” (Германия);

ферменты рестрикции, T4 ДНК-лигаза, X-Gal (5-бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактозид), белковый маркер PageRuler Prestained – “Thermo Fisher Scientific” (США);

Тақ-ДНК-полимераза, буфер для Тақ-ДНК-полимеразы, маркер для ДНК (100 bp), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты - “Сибэнзим” (Россия);

синтез праймеров осуществлялся компанией “Евроген” (Россия);

агароза – “AppliChem” (Германия);

Все остальные реактивы, использованные в работе, были марки “ОСЧ” и “ХЧ” “Реахим” (Россия);

Для иммуноблоттинга использовалась PVDF мембрана Immobilon-P – “Millipore”.

5. 2. Буферы и другие растворы, использованные в работе

Буфер ТАЕ: 40 mM Трис (трис (гидроксиметил) аминометан)-ацетат, pH 8,0; 0,2 mM ЭДТА.

Буфер ТВ: 75 mM PIPES, pH 6,8; 250 mM KCl; 55 mM MnCl₂; 15 mM CaCl₂.

Буфер для нанесения проб ДНК: 0,25% бромфенолового синего; 0,25% ксилोलцианола; 30% глицерина.

ПЦР буфер для TaqSE-ДНК-полимеразы: 60 mM Трис-HCl (pH 8,5); 25 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,1% Тритон X-100; 10 mM β-меркаптоэтанол.

Буфер для нанесения проб белка на ДСН-ПААГ (ДСН-полиакриламидный гель): 0,0625 M Трис-HCl, pH 8,4; 10% глицерин; 0,001% бромфеноловый голубой; 5% β-меркаптоэтанол; 2,3% ДСН.

Буфер для электрофореза в ДСН-ПААГ (электродный буфер): 0,025 M Трис-HCl, pH 8,4; 0,192 M глицин; 0,1% ДСН.

Фиксирующий раствор для ПААГ: 4% HClO₄; 50% этанол.

Краситель для ПААГ: 4% HClO₄; 0,04% кумасси G-250.

Буфер для получения флагеллина в мономерной форме: 10 mM Трис-HCl, pH 9,0; 8 M мочевины; 1% Тритон X-100.

Буфер для электропереноса белков: 12,5 mM Трис-HCl, pH 8,8; 45 mM глицин; 10% метанол; 0,1% ДСН.

Блокирующий буфер: 10 mM Трис-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20; 1% БСА.

Буфер TBST: 10 mM Трис-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20.

Буфер TBS: 10 mM Трис-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl.

Буфер APB: 10 mM Трис-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂.

Солевая среда для жгутиков: 3,4 M NaCl; 10 mM MgCl₂; 50 mM Трис-HCl, pH 7,0.

Сферопластирующий раствор: 1M NaCl; 27 mM KCl; 15% сахара; 50 mM Трис-HCl, pH 8,2.

5. 3. Среды

Для культивирования клеток *H. marismortui* использовались следующие среды:

Среда Hs, используемая в нашей лаборатории для культивирования *H. salinarum* (Безносков и др., 2007): 25% NaCl; 0,2% KCl; 2% Mg₂SO₄ x7 H₂O; 0,3% Na-цитрат; 0,5% триптон; 0,2% дрожжевой экстракт; pH 7,5.

Среда Tu, использовавшаяся в лаборатории П. Мура для культивирования *H. marismortui* (Tu et al., 2005): 0,85% пептон; 0,43% дрожжевой экстракт; 0,34% глюкоза; 43 mM Трис; 21,4% NaCl; 1,7% Mg₂SO₄ x7 H₂O; 0,17% KCl; 0,023% CaCl₂ x2 H₂O; 0,03% Na-цитрат; pH 7,2.

Для культивирования *H. marismortui* так же использовались среды с разной соленостью, которые готовились следующим образом: сначала готовился 30% солевой раствор содержащий 23,4% NaCl; 2,97% MgSO₄; 4,2% MgCl₂ x6H₂O; 0,6% KCl; 0,145% CaCl₂ x2H₂O, 0,08% NaBr; 0,06% NaHCO₃. После растворения солей добавляли 10 мл 1 М Tris-HCl (pH 8) и pH доводился до 7,2. Солевые растворы, содержащие 20% и 25% соли получали путем разбавления 30% солевого раствора водой. Затем к солевому раствору добавляли 10 г дрожжевого экстракта и доводили объем до 1 литра.

Среда для *Halorubrum lacusprofundi*: 20% NaCl; 0,2% KCl; 2% Mg₂SO₄ x7 H₂O; 0,3% Na-цитрат; 0,1% глутамат натрия; 0,5% гидролизат казеина; 0,5% дрожжевой экстракт; pH 7,2.

LB: 1% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 0,17 М NaCl.

SOB: 2% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 10 mM MgSO₄; 10 mM NaCl.

5. 4. Штаммы микроорганизмов

Штаммы *Haloarcula marismortui* В-1809 (DSM 3752; ATCC 43049) и *Halorubrum lacusprofundi* В-1753 (ATCC 49239, DSM 5036) были предоставлены Всероссийской коллекцией микроорганизмов (ВКМ, Институт биохимии и

физиологии микроорганизмов РАН).

Штамм *Halobacterium salinarum* R1, предоставленный Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (ВКПМ, г. Москва).

Штамм *E. coli* для генно-инженерных манипуляций XL1-Blue *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1[F'*, *proAB*, *lacI^q*, $\Delta(lacZ)M15$, *Tn10(tet)*.

5. 5. Плазмиды

Плазмида pWL102 была любезно предоставлена П. Муром (Йельский университет, Нью Хавен, США). Данная плазмида сконструирована для проведения генетических манипуляций на галофильных археях (Lam and Doolittle, 1989) и несет маркеры устойчивости к ампициллину, мевинолину, а также имеет области необходимые для репликации в клетках *E. coli* и галофильных архей.

5. 6. Методы

5. 6. 1. Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК осуществлялось с помощью QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) согласно протоколу производителя.

5. 6. 2. Выделение тотальной ДНК *H. marismortui*

Тотальную ДНК выделяли из 100 мл культуры клеток, выросших при 40 °С на Tu-среде до ОП₆₀₀ = 1. Выделение проводили по методу, описанному в Protocols for halobacterial genetics (Dyall-Smith, 2001). Согласно данному протоколу клетки осаждали при 8000 g (20 мин, 4 °С). Далее супернатант тщательно удалялся, а клетки быстро суспендировали в 4 мл воды, в результате клетки подвергались осмотическому лизису. К полученной в результате лизиса клеток суспензии добавляли протеиназу К до концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Далее для удаления РНК смесь обрабатывали РНКазой А с конечной концентрацией 10 мкг/мл при 37 °С в

течение 1 часа. Дальнейшая очистка ДНК осуществлялась последовательной экстракцией равными объемами: фенола, фенола/хлороформа (1/1), хлороформа/изоамилового спирта (24/1). Далее ДНК из водной фазы осаждали (3 объема 96% этанола; 0,1 объема 3 М NaAc, pH 5,5) и инкубировали при -20 °С 30 мин. Осадок трижды промывали раствором этанола (70%) и после подсушивания растворяли в воде.

5. 6. 3. Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась в 50 мкл смеси, состоящей из ПЦР-буфера для Taq-ДНК-полимеразы, смеси дезоксирибонуклеотидов (в концентрации 0,25 мМ каждого), олигонуклеотидов-праймеров по 30-50 пмоль каждого, 100-200 нг матричной ДНК и 5 ед. Taq-ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили в течение 30 циклов. Денатурация ДНК проводилась при 95 °С в течение 5 мин, температура и время отжига определялась экспериментально по максимальному выходу целевых продуктов реакции. Время элонгации, осуществляемой при 72 °С, подбиралось в соответствии с длиной амплифицируемых фрагментов из расчета производительности полимеразы 50 нуклеотидов в секунду.

В работе были использованы следующие пары праймеров:

pNG1005_F	ATGATCCAAGAAACGCTCCCGA
pNG1005_R	CGTGTCCGCATCAGATCATGAA
Hm_flaA2_F	AGAAAAAAGCTTACGAGAACGAACGC
Hm_flaA2_R	TCCCACTTTCTAGATTTGTAATGGTAACCTC
Hm_inB_F	TACAAATCTAGAAGACCGAGGCCAAGTG
Hm_inB_R	TCGTACTTGAAGCTTCAGTGATGTCAGAAC

5. 6. 4. Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции

Реакцию рестрикции ДНК проводили с использованием соответствующих ферментов в буферах и при условиях, рекомендуемых фирмой-производителем.

5. 6. 5. Электрофорез ДНК в геле агарозы

Электрофорез в агарозном геле (агароза в ТАЕ-буфере) проводили в ТАЕ-буфере, при напряженности поля около 5 В/см. После электрофореза гели окрашивали в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и анализировали в ультрафиолетовом свете. Размер фрагментов оценивался в сравнении со стандартным маркером для ДНК.

5. 6. 6. Очистка фрагментов ДНК

Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в геле агарозы, после чего выделяли из геля фрагмент нужного размера при помощи DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции производителя.

5. 6. 7. Лигирование ДНК

Лигирование фрагментов ДНК проводили в буферах фирм-производителей с 1-3 ед. T4 ДНК лигазы. Для лигирования обычно использовали 20-50 нг векторной ДНК и 100-150 нг фрагмента ДНК. Реакцию проводили в 40 мкл смеси в течение ночи при 18 °С.

5. 6. 8. Использование T-вектора для клонирования ПЦР-продуктов

Для прямого клонирования продуктов ПЦР использовался набор InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

5. 6. 9. Получение компетентных клеток *Escherichia coli*

Компетентные клетки получали согласно методике Inoue (Inoue et al., 1990)

с применением ДМСО. Культуру выращивали при 30 °С до плотности ОП₆₀₀=0,6 в среде LB. Далее клетки выдерживались на льду 10 мин и осаждались центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин при 4 °С. Осадок ресуспендировали в охлажденном на льду буфере ТВ (в объеме 2/5 от начального объема культуры), выдерживали на льду 10 минут, затем повторяли центрифугирование. Осадок вновь ресуспендировали в охлажденном на льду ТВ-буфере (в объеме 1/12 от начального объема культуры), добавляли ДМСО до 7%, выдерживали клетки 10 мин на льду, расфасовывали по 100 мкл и замораживали в жидком азоте. Полученные компетентные клетки хранили при -70 °С в течение 1-2 месяцев.

5. 6. 10. Трансформация компетентных клеток *Escherichia coli* плазмидной ДНК

Для одной трансформации использовали 100 мкл суспензии компетентных клеток, к которой добавляли 1 нг плазмидной ДНК или 5 мкл лигазной смеси и помещали на 30 мин в лед. После чего проводили тепловой шок при 42 °С в течение 60 секунд. После охлаждения на льду (2 мин) добавляли 0,8 мл среды SOB и инкубировали 30 мин при 37 °С. Далее 50 мкл клеточной суспензии наносили на чашки с агаризованной средой LB и инкубировали 12 часов при 37 °С. Селекция проводилась при концентрации ампицилина 100 мкг/мл.

5. 6. 11. Инактивация гена *flaB* *H. marismortui*

Для инактивации *flaB*-гена *H. marismortui* был использован метод инактивации вставкой, примененный ранее для инактивации генов флагеллинов *H. salinarum* (Tarasov et al., 2000). Генетическая конструкция для инактивации была получена на основе плазмиды pWL102, любезно предоставленной П. Муром (Йельский университет, США). Данная плазмида способна реплицироваться в *E. coli* и содержит гены устойчивости к ампициллину и антибиотику архей

мевинолину. Дополнительным преимуществом вектора pWL102 является то, что он не содержит участков гомологии с геномом *H. marismortui*. Таким образом, полученные на его основе инактивационные плазмиды могут встроиться в геном только в области гена флагеллина.

Участок гена *flaB* был получен с помощью ПЦР с использованием тотальной ДНК *H. marismortui* в качестве матрицы и праймеров Hm_inB. Продукты ПЦР после очистки и концентрирования встраивали в вектор pTZ57R/T, входящий в состав набора InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Промежуточное клонирование продуктов ПЦР в вектор pTZ57R/T с последующим их вырезанием проводилось с целью получения липких концов. Переклонирование фрагментов из вектора pTZ57R/T в вектор pWL102 проводилось по сайтам BamHI и EcoRI. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* и рассевали на агаризованную среду, содержащую ампициллин. Во время инкубации вырастали колонии, содержащие плазмиду с необходимой вставкой. Данные колонии пересеивались в жидкую среду (LB) и после инкубации из клеточной суспензии проводили выделение плазмиды. Полученной конструкцией была проведена трансформация клеток *H. marismortui*, приведшая к появлению колоний на селективной среде. Так как данная генетическая конструкция не содержала галоархейного ориджина репликации, на селективной среде могли вырасти только клетки, у которых плазида встроилась в геном по механизму гомологичной рекомбинации в области гена флагеллина, таким образом нарушив его целостность. Мутантный штамм подращивали в жидкой Tu-среде при 37 °C до OD₆₀₀ = 1,0. Далее культуры, путем точечных уколов (объем засеваемой культуры 2 мкл), высевали на чашку с полужидкой агаризованной Tu-средой (0,25% агар). Контролем служили клетки дикого типа. Рост посевов оценивали спустя 5 суток.

5. 6. 12. Выделение жгутиков

Выделение жгутиков проводилось с помощью осаждения полиэтиленгликолем 6000 по методике, описанной Gerl et al. (1989) с модификациями. Для выделения жгутиков культуру клеток выращивали в литровых колбах с 200 мл среды при хорошей аэрации до поздней стационарной фазы. Полученную биомассу осаждали центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. К супернатанту, полученному после осаждения клеток, добавляли ПЭГ 6000 до 4% и затем осаждали жгутики центрифугированием при 15000 g в течение 45 мин. Затем, для очистки жгутиков использовали центрифугирование в градиенте плотности CsCl (12 часов при 45000 об/мин, ротор VTI-80, Beckman, США). Хлористый цезий растворяли в солевой среде для жгутиков до получения плотности 1,36 г/см³. Фракция, содержащая жгутики, образовывала видимую зону в средней части пробирки. Ее отбирали, разводили (в 10 раз) в солевой среде и, далее, жгутики переосаждали центрифугированием при 80000 g в течение 1,5 часа. Концентрацию флагеллина определяли при помощи набора Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, США), согласно методике производителя.

5. 6. 13. Электрофорез белков в ДСН-ПААГ

Электрофорез в ДСН-ПААГ проводили по методу Лэммли (цит. по Остерман, 1981). Гелевая пластина состояла из верхнего концентрирующего (5% акриламида; 0,08% МБА (N,N-метиленабисакриламид); 0,1% ДСН; 0,125 М Трис-НСl, рН 6,8) и нижнего разделяющего (15% или 7% акриламида при исходном соотношении акриламид/МБА – 40%/0,8%; 0,1% ДСН; 0,375 М Трис-НСl, рН 8,8) гелей. Для полимеризации гелей на 15 мл раствора добавляли 10 мкл ТЕМЕД и 50 мкл 10% ПСА (персульфат аммония). Для проведения электрофореза использовали электродный буфер. Перед нанесением на гель препараты белка смешивали с равным объемом буфера для нанесения проб белка на ДСН-ПААГ

(см. Буферы) и кипятили на водной бане 3 мин. Режим электрофореза: 20 мА до вхождения образцов в разделяющий гель, затем 50 мА. После окончания электрофореза образцы в геле фиксировали в фиксирующем растворе и окрашивали в красителе в течение 15 мин при 90-100 °С. Отмывку гелей производили кипячением в дистиллированной воде. Подвижности белков определяли, сравнивая их относительную подвижность при электрофорезе в ДСН-ПААГ с относительной подвижностью белков-маркеров.

5. 6. 14. Специфическое окрашивание для идентификации гликопротеинов

Наличие в белках сахаров определяли по результатам специфического окрашивания непосредственно в ДСН-ПААГ, используя реагент Шиффа (Doernper and White, 1990). ПААГ после электрофореза помещался на ночь в раствор, содержащий 25% изопропанола, 10% уксусной кислоты при комнатной температуре и слабом перемешивании. Затем гель инкубировался в 2,5% уксусной кислоте в течении 30 минут, после чего помещался в 0,2% раствор йодной кислоты на один час. Далее гель инкубировался в реагенте Шиффа в течении часа, отмывался в 7,5% уксусной кислоте (1 час) и окончательно в дистиллированной воде.

5. 6. 15. Сканирующая микрокалориметрия

Калориметрические измерения проводились на дифференциально-сканирующем микрокалориметре СКАЛ-1 (ЗАО "СКАЛ", Пущино, Россия) при скорости нагревания 1 °С/мин. Рабочий объем золотой ячейки составлял 0,3 мл. концентрация белка в образцах, используемых в экспериментах, составляла 1 – 0,5 мг/мл. Измерения и расчеты проводились Е. И. Тиктопуло согласно (Privalov and Potekhin, 1986) и подробно описаны в (Tarasov et al., 1995).

5. 6. 16. Масс-спектрометрия

Масс-спектральный анализ проводился А. К. Суриным (Институт белка РАН) на жидкостном хроматографе, связанном с масс-спектрометром на базе ионной ловушки (LCQ DecaXP, Thermo Finnigan, США), оснащенным источником ионов типа наноэлектроспрей. Образец белкового препарата в ПААГ вырезали из геля после электрофореза. Для повышения уровня достоверности идентификации белков использовали три протеазы: трипсин, пепсин и протеаза *Staphylococcus aureus* V8. После протеолиза жидкость удаляли из геля с помощью вакуумного центрифугирования. Для проведения масс-спектрометрии образцы растворяли в 15 мкл воды LiChrosolv (Merck), содержащей 0,5% ТХУ. Ионизованные пептиды элюировали из колонки nanoLC и анализировали с использованием техники CAD фрагментации. Данные по MS/MS пептидов, полученных с использованием различных протеаз, были объединены и использованы для идентификации исходных белков. Полученные данные анализировали с помощью программы Mascot (Matrix Science, UK) (Perkins et al., 1999).

5. 6. 17. Электронная микроскопия

Для получения электронных микрофотографий использовался микроскоп JEM-100с (“JEOL”, Япония). Электронно-микроскопические фотографии с бóльшим увеличением получали на микроскопе CM12 (“FEI”, Нидерланды). Для приготовления электронно-микроскопических образцов препараты наносили на электронно-микроскопические медные сетки с формваровой пленкой-подложкой, выдерживали 1 мин и отбирали раствор фильтровальной бумагой, после чего помещали сетку на раствор 2% уранилацетата, выдерживали 30 сек, отбирали раствор фильтровальной бумагой и высушивали.

Реконструкция FlaB-филаментов *H. marismortui* была получена в группе Эдварда Эгельмана (Университет Вирджинии, США) по методике, описанной в

(Egelman, 2000). За основу были взяты электронно-микроскопические фотографии, полученные с помощью негативного контрастирования уранилацетатом на электронном микроскопе Tecnaï 12 (FEI Company, США).

5. 6. 18. Ограниченный протеолиз филаментов *H. marismortui*

Филаменты *H. marismortui* выдерживали в течение 20 мин при концентрации 0,1 мг/мл при 65 °С. Ограниченный трипсинолиз филаментов *H. marismortui* проводили при комнатной температуре в 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, содержащем 20% NaCl и 10 мМ MgCl₂. Флагеллины в буфере смешивали с ферментом в различных соотношениях. Трипсин и соевый ингибитор трипсина предварительно растворяли в буфере того же состава до концентрации 1 мг/мл. Трипсинолиз проводили при концентрациях филаментов от 0,1 до 1 мг/мл и соотношениях белок/фермент от 5 до 500. Трипсинолиз останавливали добавлением эквимольного количества соевого ингибитора.

5. 6. 19. Изучение гетерогенности флагеллинов *H. marismortui* и *H. lacusprofundi*

Анионообменная хроматография проводилась с помощью системы FPLC на анионообменной колонке “monoQ” посредством градиентной элюции (0–1 М NaCl) в буфере для получения флагеллина в мономерной форме. Скорость потока составляла 0,3 мл/мин.

Для получения устойчивой к трипсинолизу формы флагеллина FlaB (FlaB-r) филаменты *H. marismortui* выдерживали в течение 20 мин при концентрации 0,1 мг/мл при 65 °С. После охлаждения до комнатной температуры добавляли трипсин в количестве 1 мг на 5 мг филаментов. Через 10 ч трипсинолиз останавливали добавлением эквимольного количества соевого ингибитора. Затем центрифугировали реакцию смесь 30 мин при 70000 об/мин на центрифуге TL-100 (“Beckman”, США). Осажденные полимеры содержали как

нерасщепленный флагеллин FlaB-r, так и смесь триптических фрагментов. Для удаления триптических фрагментов флагеллина осадок разводили в 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, содержащем 7% NaCl и 10 мМ MgCl₂, и центрифугировали при тех же условиях. Полученный после центрифугирования осадок включал наряду с FlaB-r триптические фрагменты, содержащие низкомолекулярные гидрофобные N-концевые участки флагеллина, а фрагменты, соответствующие С-концевым и центральным участкам флагеллина, оставались в супернатанте. Полученный осадок разводили в 10 мМ Трис-НСl, рН 9,0, содержащем 8 М мочевины и 1% Тритона X-100.

5. 6. 20. Трансформация клеток *H. marismortui*

Трансформация клеток *H. marismortui* выполнялась с использованием ПЭГа по методике, описанной Cline et al. (1989) с модификациями. Сферопласты получали отдельно для каждой аликвоты (2 мл) клеточной культуры. Клетки осаждали в 2 мл пробирках центрифугированием при 4000 g в течение 10 минут и затем ресуспендировали в 200 мкл сферопластирующего раствора. Сферопласты образовывались после добавления 20 мкл 0,5 М EDTA в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем, в объеме 10 мкл добавлялась ДНК (около 2 мкг) и смесь инкубировалась в течении 5 минут, после чего добавлялся равный объем раствора, содержащего 60% ПЭГ600 и 40% сферопластирующего раствора. Клетки инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. После этого добавляли 1 мл Tu-среды и клетки осаждали при 4000 g в течение 10 минут, после чего удаляли супернатант, осадок ресуспендировали в 1 мл Tu-среды и переносили в 50 мл пробирку с 10 мл Tu-среды. Затем клетки инкубировали при 42 °С в течение 24 часов с покачиванием. После этого клетки высевали на чашки Петри в верхний агар (0,5%), содержащий антибиотик мевинолин в концентрации 2 мкг/мл. При инкубации чашек при 37 °С колонии вырастали примерно через 4 недели.

5. 6. 21. Получение поликлональных антител

Антисыворотки получали иммунизацией кроликов очищенными жгутиками, по 0,1 мг белка на каждую инъекцию, используя метод, описанный в (Southam et al., 1990). Через три дня после последней иммунизации из ушной вены отбирали по 25 мл крови. Образовавшийся тромб осаждали центрифугированием при 5000g 30 минут. Затем к двум объемам сыворотки добавляли один объем насыщенного водного раствора сульфата аммония и, после выдерживания в течение часа при 4 °С, центрифугировали при 5000 g 30 минут. Осадок растворяли в дистиллированной воде и хранили при -20 °С.

5. 6. 22. Иммуноблоттинг

Электроперенос белков, разделенных электрофорезом в ДСН-ПААГ, на PVDF мембрану осуществляли в буфере для переноса при 300 мА в течение 2 часов, при комнатной температуре. После переноса мембрану инкубировали в течение ночи при 4 °С в блокирующем буфере. Затем в буфере TBST с первичными антителами (разведение 1:1000) в течение 30-60 мин при комнатной температуре и слабом перемешивании. Отмывку мембраны производили в TBST буфере по 10 минут 3 раза и далее инкубировали с вторичными антителами (разведение 1:5000), конъюгированными со щелочной фосфатазой (30-45 минут при перемешивании). Затем мембрану отмывали в TBST буфере 3 раза по 10 минут, споласкивали последовательно в буфере TBS и буфере APB. Краситель готовился непосредственно перед окрашиванием из реактивов набора ProtoBlot Western Blot Ap (Promega) следующим образом: 66 мкл NBT добавляли к 10 мл APB и затем 33 мкл BCIP. Мембрана размером 10x15 см требовала около 15 мл раствора. Окрашивание проводилось в течение 5 - 15 минут, затем мембрана переносилась в дистиллированную воду.

5. 6. 23. CHN-анализ

Элементный анализ флагеллинов *H. marismortui* проводился И.П. Столяровым (Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова, РАН) на модернизированном CHN-анализаторе (“Carlo Erba Instruments”, Италия). В качестве контроля использовали бычий сывороточный альбумин.

5. 6. 24. Выделение триптического фрагмента FlaB-флагеллина

H. marismortui (TF-FlaB) и определение его границ

Ограниченный протеолиз филаментов *H. marismortui* проводился при комнатной температуре в буфере, содержащем 20% NaCl, 10 mM MgCl₂ и 10 mM Трис-НСl (рН 7,5). Трипсин и соевый ингибитор трипсина были предварительно растворены в том же буфере до концентрации 1 мг/мл. Концентрация филаментов составляла 0,1-1 мг/мл. Частичная денатурация филаментов проводилась путем их прогрева при 65 °С в течение 20 минут. После охлаждения, к образцам был добавлен трипсин, массовое соотношение белок:фермент составляло 50:1. По прошествии 3 часов трипсинолиз был остановлен путем добавления эквимольного количества соевого ингибитора трипсина. Затем реакционная смесь центрифугировалась в течение 30 мин при 70000 об/мин на центрифуге TL-100 (“Beckman”, США). Полученный осадок состоял из нерасщепленного флагеллина и продуктов протеолиза. Для отделения фрагментов осадок был ресуспендирован в буфере, содержащем 7,5% NaCl, 10 mM MgCl₂ и 10 mM Трис-НСl (рН 7,5), после чего был повторно отцентрифугирован при тех же самых условиях. Осадок содержал нерасщепленный флагеллин FlaB и фрагменты, содержащие гидрофобный N-конец, в то время как в супернатанте были водорастворимые триптические фрагменты. Для дополнительной очистки была использована гель-фильтрация на колонке Superose 12HR, уравновешенной буфером содержащем 10 mM Трис-НСl (рН 7,5), 20% NaCl и 10 mM MgCl₂. Фракционирования проводилось при скорости потока 0,2 мл/мин, объем каждой

фракции составлял 0,4 мл. Фракции, содержавшие TF-FlaB в наиболее чистом виде (по результатам электрофореза в ДСН-ПААГ), были сконцентрированы используя Amicon Ultra-4 Ultracell-3 k (Millipore) до концентрации 1-2 мг/мл и использовались в дальнейших экспериментах.

Определение границ триптического фрагмента проводилось методами секвенирования с N-конца и масс-спектрометрии. N-концевое секвенирование TF-FlaB проводилось в W. M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory, Йельский университет, Нью Хавен, США. Последовательность TYGDPVNG совпала с последовательностью FlaB-флагеллина в положении 175-182 аминокислотных остатков. Масс-спектрометрия TF-FlaB проводилась после его обработки следующими протеазами: трипсин, пепсин и V8-протеаза (эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8). Данные MS/MS для пептидов, полученных для всех трех протеаз подтвердили наличие последних C-концевых аминокислотных остатков FlaB (SGETAVQV) в TF-FlaB.

5. 6. 25. Биоинформатический анализ флагеллинов *H. marismortui*

Вычисление значений алифитических индексов (AI) и изоэлектрических точек флагеллинов *H. marismortui* проводилось на основании аминокислотных последовательностей зрелых белков (без сигнального пептида) с помощью программы ProtParam, доступной по адресу: <http://web.expasy.org/protparam/> (Gasteiger et al. 2005).

Поиск упорядоченных/неупорядоченных участков в структуре флагеллинов *H. marismortui* проводился с помощью программы IsUnstruct, доступной по адресу: <http://bioinfo.protres.ru/IsUnstruct/> (Lobanov and Galzitskaya, 2011; Lobanov et al., 2013). Проверка надежности предсказания проводилась с использованием мета-сервера PONDR-FIT (Xue et al., 2010).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

6. Изучение молекулярной организации жгутиков

H. marismortui

6. 1. Выделение и характеристика жгутиков *H. marismortui*

Галофильный археон *H. marismortui* был выделен из Мертвого моря и изначально описан как не проявляющий ярко выраженной подвижности. При наблюдении в оптический микроскоп лишь небольшая часть клеток была подвижна, причем данная подвижность проявлялась во вращении клеток вокруг своей оси (Oren et al., 1990). Секвенирование генома данного организма показало наличие полного набора генов системы подвижности (Baliga et al., 2004). Кроме кластера *fla*-ассоциированных генов в геноме было аннотировано три гена флагеллина – *flaB*, расположенный на хромосоме I вблизи *fla*-локуса, *flaA1* – на хромосоме II и *flaA2* на плазмиде pNG100. Надо сказать, что такое расположение генов флагеллинов, когда каждый ген располагается на отдельном репликоне, является крайне редким, и обычно все гены флагеллинов располагаются на основной хромосоме. Предполагаемые белковые продукты *flaA2*- и *flaB*-генов имели размер 463 и 454 аминокислотных остатка соответственно и обладали характерными чертами архейных флагеллинов, такими как наличие сигнального пептида (12 аминокислотных остатков) и высококонсервативный N-конец. В то же время, гипотетический белковый продукт *flaA1*-гена имел длину всего 84 аминокислотных остатка и не содержал сигнального пептида и, следовательно, был неспособен к секреции и формированию нити жгутика. Таким образом, в геноме *H. marismortui* имеется лишь два “полноценных” гена флагеллинов.

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* в лаборатории Мура (Tu et al., 2005). 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 11).

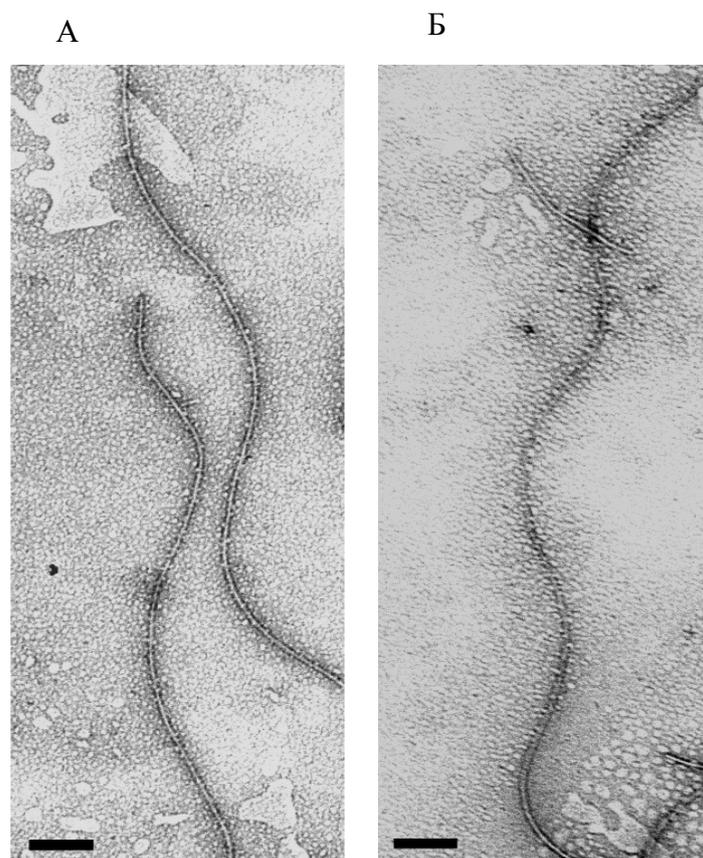


Рисунок 11. Электронно-микроскопические фотографии препаратов жгутиковых филаментов *H. marismortui*. А) филаменты, выделенные из культуры, росшей изначально на Tu-среде; Б) филаменты, выделенные из культуры, росшей изначально на HS-среде. Масштабная линейка – 200 нм. Результаты получены совместно с С. Н. Безносовым.

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 12 приводится электрофореграмма для 7% ДСН-ПААГ).

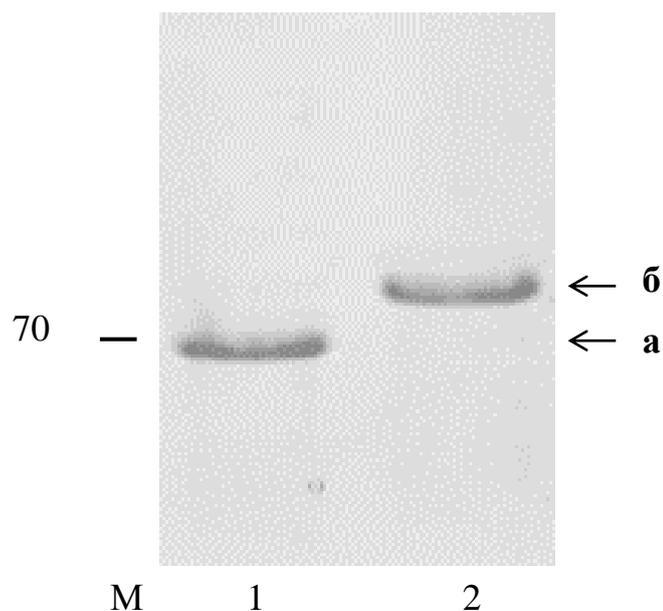


Рисунок 12. Электрофореграмма препаратов жгутиков *H. marismortui* в ДСН - ПААГ (7%). Трек: 1) препарат жгутиков, выделенный из культуры, росшей изначально на Tu-среде; 2) препарат жгутиков, выделенный из культуры, росшей изначально на среде HS. М – белковый маркер (кДа).

Масс-спектрометрия соответствующих белковых полос показала, что из культуры, засеянной непосредственно в Tu-среду, выделяются жгутики, состоящие из FlaA2-флагеллина (белковая полоса **a** на рисунке 12), в то время как из культуры росшей сначала в HS-среде выделялись жгутики, состоящие из FlaB-флагеллина (белковая полоса **b** на рисунке 12) (таблица 1). 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 (Matagne et al., 1991), а также, как правило, имеют посттрансляционные модификации, в частности гликозилирование (Wieland et al., 1985; Calo et al., 2010). 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.

Таблица 1. Данные по идентификации белков жгутиков *H. marismortui* с использованием программы Mascot.

Белковая полоса в ДСН-ПААГ	Последовательность	Белок	Совпадающие позиции
(a)	IQVASKVGIVGGQGAS	<u>Q5V881_HALMA</u> Флагеллин FlaA2. - <i>Haloarcula marismortui</i>	62-77
"	VASKVGIVGGQGASDTIA	"	64-81
"	VDSPQGNEL	"	114-122
"	DTGVSITSSKL	"	146-156
"	DLKDASGSDLKFL	"	157-169
"	VRTYEDPVNGQLQL	"	170-183
"	YLSGTAGSGSTLKL	"	290-303
"	IKGSGADQINM	"	358-368
"	PVMTDSDRF	"	410-418
"	IRISVPNTLAGESAVQV	"	447-463
"	SAVQV	"	459-463
(б)	IQVASKIGSVAGSGPTD	<u>Q5V0B8_HALMA</u> Флагеллин FlaB - <i>Haloarcula marismortui</i>	62-78
"	IQVASKIGSVAGSGPTDTII	"	62-81
"	VASKIGSVAGSGPTDT	"	64-79
"	IIVEGET	"	80-86
"	FAIDSGSTL	"	89-97
"	AIDSGSTL	"	90-97
"	AGDSDTND	"	160-167
"	FQRTYEDPVNGE	"	172-183
"	YLPLTGD	"	213-219
"	VIVSDGETL	"	226-234
"	ITVASST	"	243-249
"	IDTASAL	"	288-294
"	TSSGQITGL	"	307-315
"	SSGQITGL	"	398-315
"	VSLTTSQVL	"	320-328
"	IAIKGSGADQINL	"	347-359
"	IGPSGTNNTL	"	367-375
"	SATEGETF	"	381-388
"	TDADRF	"	404-409
"	RIIVNPGTL	"	410-418
"	RIIVNPGTLE	"	410-419
"	RIIVNPGTLETGE	"	410-422
"	RIIVNPGTLETGET	"	410-423
"	IRVSVPNTLSGETA	"	438-451

Обнаруженный нами факт наличия двух штаммов, отличающихся белковым составом жгутиков, напоминает явление фазовой вариации, описанное для Энтеробактерий, у которых данный механизм служит способом защиты от иммунного ответа организма-хозяина (Ikeda et al., 2001). Мы решили установить, каким образом регулируется белковый состав филаментов у *H. marismortui*. Так как ген FlaA2-флагеллина располагается на плазмиде pNG100, мы предположили, что возникновение FlaB-штамма является результатом утраты данной плазмиды. Для проверки этого предположения мы провели ПЦР с использованием двух пар праймеров к двум различным и удаленным друг от друга участкам плазмиды pNG100: праймеров Hm_pNG1005 (амплифицируют локус pNG1005) и праймеров Hm flaA2 (амплифицируют локус pNG1026, кодирующий *flaA2*-ген). Результаты данного эксперимента показали, что ПЦР-продукты отсутствовали при использовании в качестве матрицы ДНК FlaB-штамма, в то время как при использовании ДНК FlaA2-штамма ПЦР-продукты нарабатывались (рисунок 13). Полученные результаты показывают, что в клетках FlaB-штамма отсутствует плазида pNG100. Из этого следует, что штаммы, названные нами как FlaA2 и FlaB, являются штаммом дикого типа и штаммом, утратившим плазмиду (pNG100⁻), соответственно. Таким образом, белковый состав жгутиков *H. marismortui* определяется плазмидой, что является первым фактом такого рода в домене Архей.

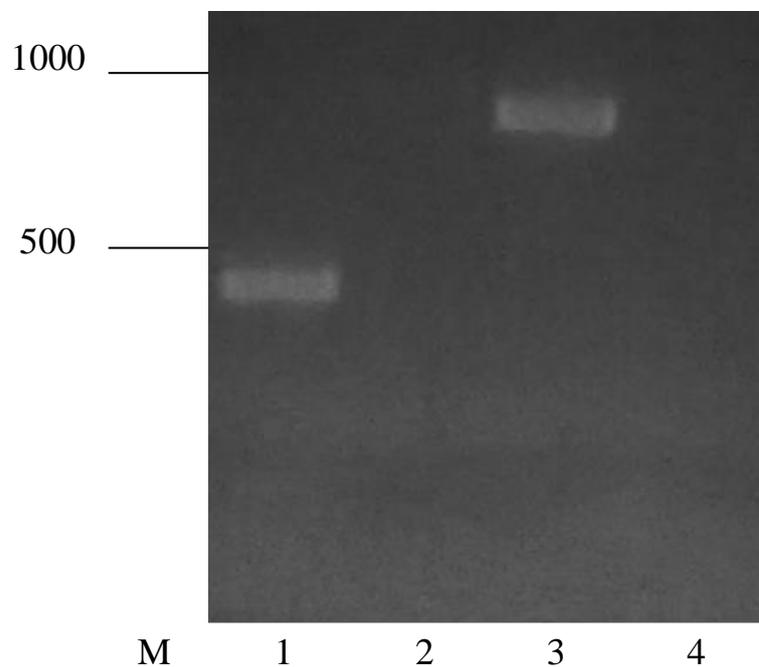


Рисунок 13. Наличие плазмиды pNG100 в клетках *H. marismortui*. Трек: 1 и 2 – праймеры Hm-pNG1005, FlaA2- и FlaB-штамм, соответственно; 3 и 4 – праймеры Hm-flaA2, FlaA2- и FlaB-штамм, соответственно. М – ДНК-маркер (п.н.).

Дополнительным следствием приведенных выше результатов является тот факт, что жгутики, синтезируемые клетками FlaB-штамма, строятся исключительно из FlaB-флагеллина. В связи с этим было интересно проверить идет ли синтез FlaB-флагеллина в клетках FlaA2-штамма или же жгутики строятся исключительно из FlaA2-флагеллина. Для этого были получены антитела против FlaB-флагеллина, и с помощью иммуноблоттинга нам удалось показать, что жгутики, выделяющиеся из клеток FlaA2-штамма, содержали незначительную примесь FlaB-флагеллина (рисунок 14). Можно предположить, что плаزمид рNG100 несет в своем составе ген белка-репрессора, подавляющего (но не полностью) биосинтез FlaB-флагеллина в клетках FlaA2-штамма.

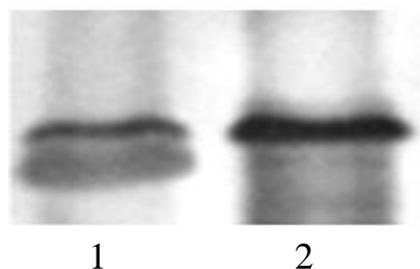


Рисунок 14. Иммуноблоттинг препаратов жгутиков после электрофореза в 7% ДСН-ПААГ. Трек: 1) FlaA2-филаменты; 2) FlaB-филаменты. Первичные антитела были получены против FlaB-жгутиков.

Электронная микроскопия препаратов FlaA2- и FlaB-филаментов показала, что они имели отчетливую спиральную форму (рисунок 11). Кроме того, толщина жгутиков, состоящих из FlaA2-флагеллина, составляла 20-22 нм, а состоящих из FlaB – 16-18 нм, что заметно больше толщин ранее изученных жгутиков Архей (рис. 15). Данные результаты вместе с тем фактом, что жгутики, выделяемые из клеток FlaB-штамма, состоят исключительно из FlaB-флагеллина, 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 (Tarasov et al., 2000; Chaban et al., 2007). Таким образом, несмотря на то что флагеллины у Эвриархей являются достаточно близкородственными белками, они могут использовать разные принципы формирования нити жгутика.

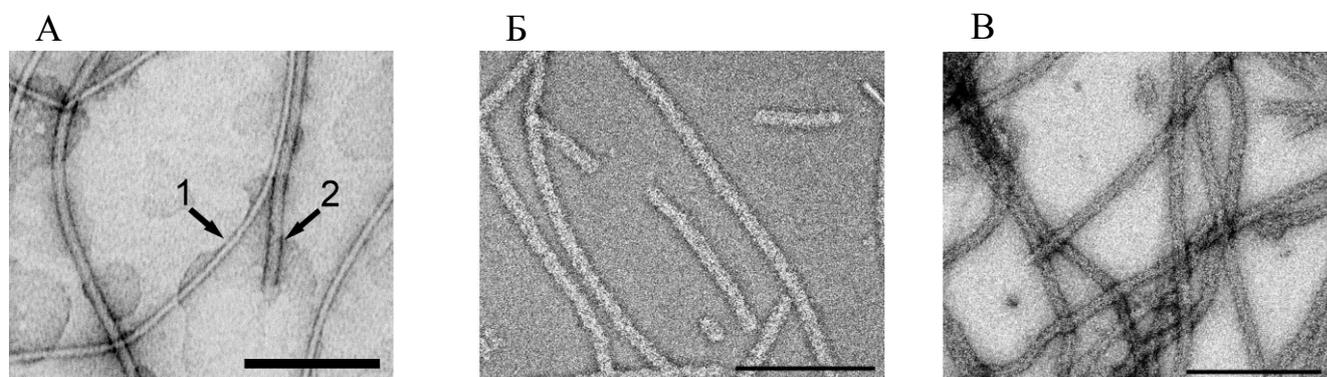


Рисунок 15. Электронно-микроскопические фотографии препаратов жгутиковых филаментов *H. marismortui*. А) смесь филаментов жгутиков *H. salinarum* (стрелка 1) и FlaA2 филаментов *H. marismortui* (стрелка 2); Б), В) электронно-микроскопические фотографии FlaA2- и FlaB-филаментов при бóльшем увеличении. Масштабная линейка – 200 нм. Результаты получены совместно с С. Н. Безносовым и Р. Рахелем.

В сотрудничестве с группой Эдварда Эгельмана из Университета Вирджинии была исследована тонкая структура филаментов состоящих из FlaB-флагеллина. На основании электронно-микроскопических фотографий была построена пространственная реконструкция данных структур (рисунок 16). Из полученной реконструкции видно, что филамент состоит из коровой части, сходной с коровой частью филаментов *H. salinarum*, а также структурно обособленной “оболочки”, ранее не наблюдавшейся для жгутиков архей (результаты были представлены в 2010 году на международной конференции “Molecular biology of Archaea II”, Великобритания, Кэмбридж). Так как размер флагеллинов *H. marismortui* примерно в два раза превышает размеры флагеллинов *H. salinarum* мы полагаем, что данная “оболочка” формируется частью полипептидной цепи FlaB-флагеллина.

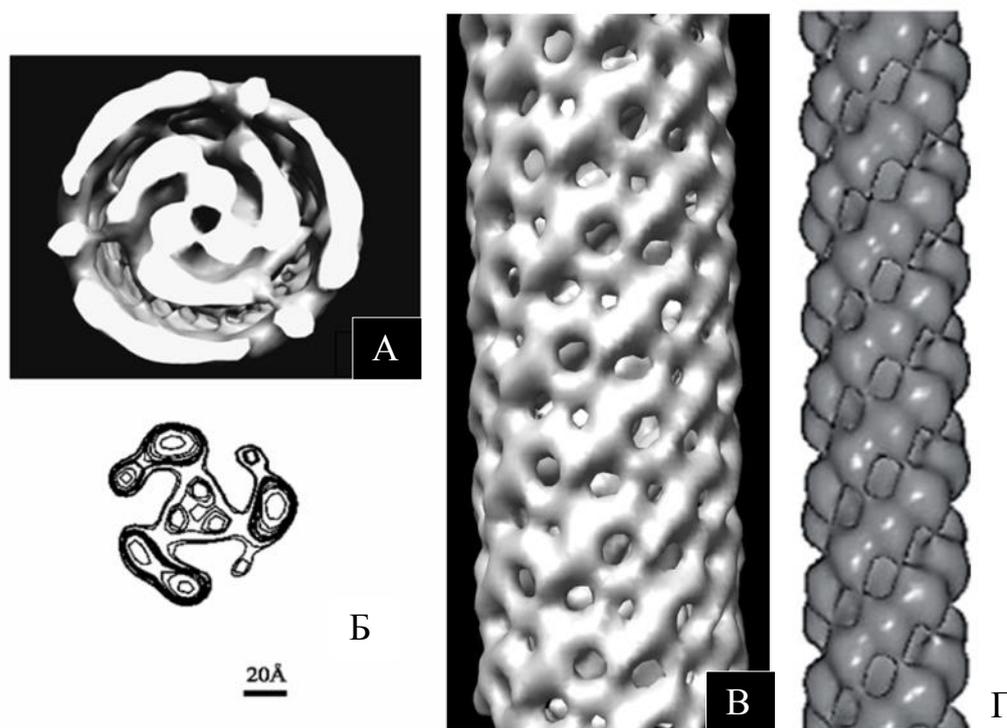


Рисунок 16. Сравнение реконструкций филаментов *H. marismortui* (FlaB) и *H. salinarum*. Поперечный срез и боковая поверхность филаментов *H. marismortui* (А, В) и *H. salinarum* (Б, Г). Данные по реконструкции филаментов *H. salinarum* взяты из (Cohen-Krausz and Trachtenberg, 2002).

Следующим шагом исследования жгутиков *H. marismortui* стало выяснение вопроса о возможных отличиях в подвижности FlaA2- и FlaB-штаммов. Как уже было сказано выше, изначально *H. marismortui* была описана как в основном неподвижная. Для сравнения подвижности FlaA2- и FlaB-штаммов мы воспользовались стандартным методом микробиологии - высевом на полужидкую агаризованную среду. Через несколько дней инкубации мы обнаружили, что оба штамма образовали пятна вокруг точек посева (рисунок 17), что говорит о том, что как FlaA2- так и FlaB-штамм 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.

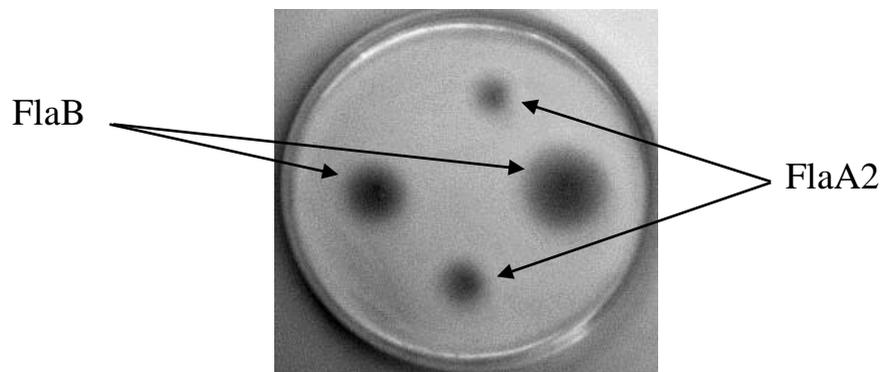


Рисунок 17. Сравнение подвижностей FlaA2- и FlaB-штаммов *H. marismortui* (0,3% агаризованная Tu-среда). Время инкубации – 5 дней (42 °C).

В настоящее время для архей описана подвижность только с использованием жгутиков. Для того чтобы однозначно показать, что в случае *H. marismortui* подвижность обусловлена аппаратом жгутиковой подвижности мы, на основе FlaB-штамма, получили штамм с инактивацией *flaB*-гена флагеллина. Для этого в плазмиду pWL102, содержащую маркеры устойчивости к ампициллину и мевинолину, был встроено участок нуклеотидной последовательности *flaB*-гена флагеллина. Полученной плазмидной конструкцией была проведена трансформация клеток FlaB-штамма *H. marismortui*, после чего они были высеяны на агаризованную Tu-среду, содержащую антибиотик мевинолин. Выросшие на чашке колонии, у которых произошла инактивация гена флагеллина, были затем пересеяны в жидкую и на полужидкую агаризованную среды. Клетки полученного мутантного штамма (FlaB-inB) были неподвижны на полужидкой агаризованной среде в сравнении с клетками дикого типа и не синтезировали FlaB-флагеллин (рисунок 18). Данный результат является доказательством того факта, что подвижность клеток *H. marismortui* опосредована аппаратом жгутиковой подвижности.

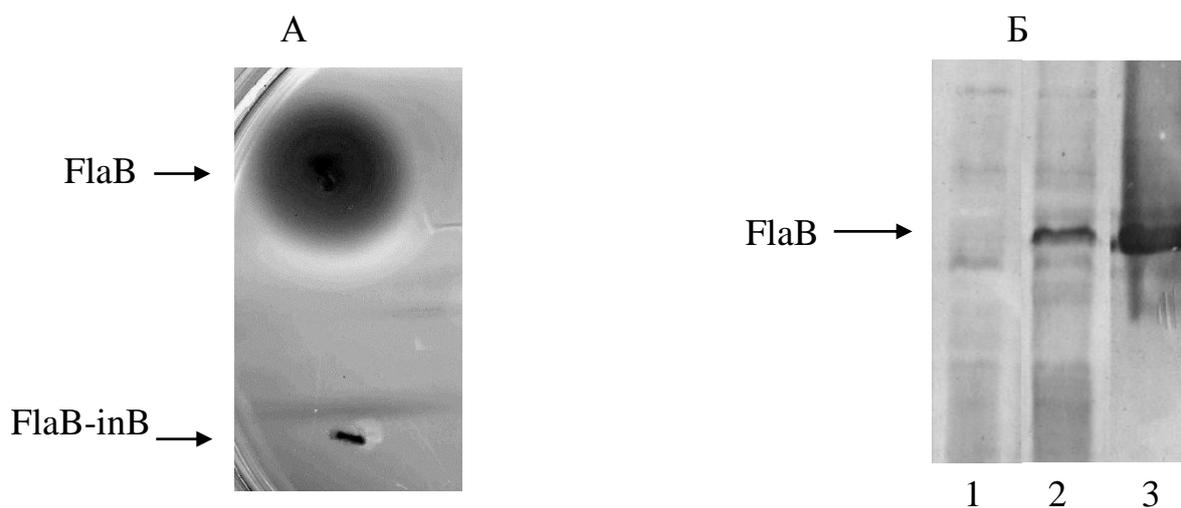


Рисунок 18. Инактивация *flaB*-гена. А) Сравнение подвижностей штамма с инактивацией *flaB*-гена и FlaB-штамма *H. marismortui* (0,25% агар). Б) детекция с помощью иммуноблоттинга FlaB флагеллина в лизатах клеток: 1) лизат клеток FlaB-inB; 2) лизат клеток FlaB штамма; 3) Жгутики FlaB.

6. 2. Сканирующая микрокалориметрия.

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 °C (пик 1), 80 °C (пик 2) для FlaA2-жгутиков и 55 °C (пик 1), 84 °C (пик 2) для FlaB-жгутиков (рисунок 19). Как видно, FlaB-жгутики более чувствительны к повышению температуры, чем FlaA2.

Результаты по плавлению филаментов *H. marismortui* отличаются от данных, полученных для филаментов *H. salinarum*, все пять флагеллинов которых имеют сходные термодинамические свойства, и на кривых плавления наблюдается единственный пик теплопоглощения, соответствующий одному домену (Tarasov et al., 1995). Повторное прогревание как частично (пик 1), так и полностью (пик 2) денатурированных образцов жгутиков *H. marismortui* показало полную необратимость процесса тепловой денатурации.

Кроме того, мы изучали влияние прогревания на морфологию филаментов. Жгутики наблюдали в электронный микроскоп до прогревания, непосредственно после нагревания до температур, соответствующих пикам теплопоглощения, и после нагревания до 110 °С. Было обнаружено, что жгутики *H. marismortui*, подобно жгутикам других галофильных архей, и в противоположность бактериальным, не диссоциируют после прогрева. Интересен тот факт, что жгутики *H. marismortui* (в особенности, состоящие из FlaA2) сохраняют отчетливую спиральную форму даже после нагревания до 90 °С (рисунок 20).

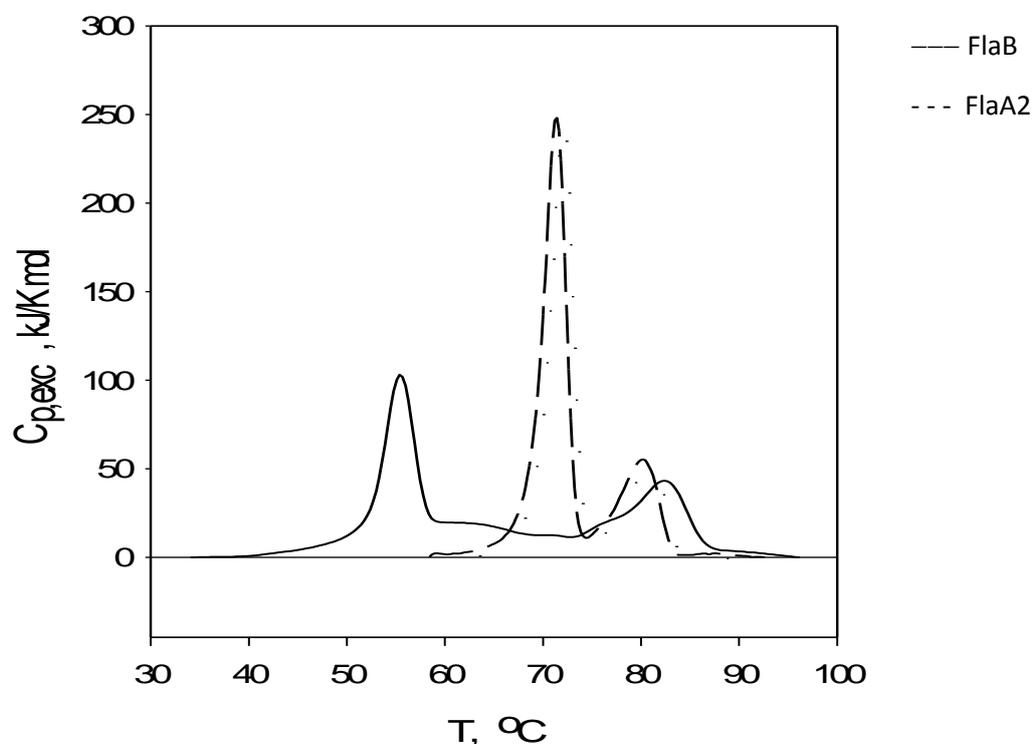


Рисунок 19. Кривые плавления препаратов FlaA2- и FlaB-жгутиков. Результаты получены совместно с Е. И. Тиктопуло.

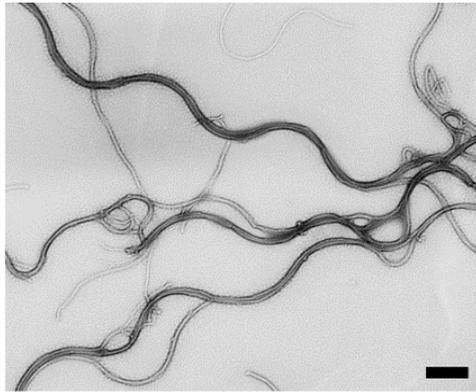


Рисунок 20. Электронно-микроскопическая фотография FlaA2-филаментов после прогрева до 90 °С. Масштабная линейка – 200 нм. Результаты получены совместно с С. Н. Безносовым.

6. 3. 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 (рисунок 21А). 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 (рисунок 21Б). Первый участок гомологии FlaA2 находится в районе с 1 по 138 аминокислотный остаток (сходен с областью с 1 по 154 аминокислотный остаток FlgA1 *H. salinarum*), второй участок с 322 по 461 аминокислотный остаток (сходен с областью с 47 по 194 аминокислотный остаток FlgA1). У FlaB первый участок гомологии располагается с 1 по 135 аминокислотный остаток (гомологичен участку 1-154 аминокислотный остаток FlgA1) и второй участок 308-452 аминокислотный остаток (гомологичен участку 45-194 аминокислотный остаток FlgA1). Из приведенных данных можно сделать предположение, что сравнительно крупные флагеллины *H. marismortui* являются

продуктом дубликации и последующего слияния, по крайней мере, двух меньших по размеру генов флагеллинов.

FlaA2 1 MFEKIANENERGQVIGIGTLIVFIAMVLVAAIAAGVLINTAGFLQSSAEQTGQESSDQVTNQIQVASKVGI VGGQASDTIAIQSPSGNQFAIESGSTVTATEVTDNNDGYILVDSPOGN 120
 FlaB 1 MFERITNPEDRGQVIGIGTLIVFIAMVLVAAIAAGVLINTAGFLQSSAEQTGQESSDQVTNQIQVASKIGSVAGSCPTDTIIVEGET-IQFAIDSGSTLTVSS-TSAGDSNLANLDGQDG- 117

FlaA2 121 ELAVDGGDQIRLTRESGSQVEITNEDTGV SITSSK----LDLKDASGS--DTLKFRVRYEDPVNGQLQLQSVTIDNTGTADSTDDGVSATLSTGENTEKYIPLTDGSSKA---ITGNGET 231
 FlaB 118 EVAVEQGD EIRFTRESTSTISVTNTEGTASTTVSEGTDTLSLAGDSDTNDTIVTFRVRYEDPVNGEVDITSVTL-NDGESTSA---VSADLENSQNT EQYLPLTGDDSNSDDVIVSDGET 233

FlaA2 232 VTVTSDSDSGSTLSAGAEILSVDPGDEVLEFVETGDS E VITITNQESGSSISYNPLDGSNYLSGTAGSGSTLKL SVSDDGSATS LDVTSGLTGLTTGDFATGPGNEIQLVNEDYNA GGGGVG 351
 FlaB 234 LSATSGS---SDITVASSITITINQGDVTFDVIANDEVKITNENTGDSVSNFPFDNQ-----IDTASALTLE-NDGDQIITTS SGOITGLASSEVSLTT-SQVLLVNEDYSTGGGVG 342

FlaA2 352 TLNIVAIKSGADQINMEETTITTIGEDGNTNLTYSDDGATEDQTEFAVESIQDDDSL PVMTDSDRFRVVIDPGTLETGETMTLEVTTESGATTEIRISVPNTLAGESAVQV 463
 FlaB 343 EISVIAIKSGADQINLEETTITTIGESGNTNLT YGCNSATEGETFGVQAVQDEDSL PVMTADRFRIIVNPGTLETGETMTLEVTTESGATTEIRISVPNTLSGETAVQV 454

A

HM 1 MFEKIANENERGQVIGIGTLIVFIAMVLVAAIAAGVLINTAGFLQSSAEQTGQESSDQVTNQIQVASKVGI VGGQASDTI-----AIQSPSGNQFAIESGSTV-----TATEVT---DN 106
 HS 1 MFEFITDEDERGQVIGIGTLIVFIAMVLVAAIAAGVLINTAGFLQSKGSATGEEASAQVSNRINIVSAYGNVKTASGTDIVDYANLTVRQAAGADNINLSKSTIQWIGPDTATTLTYDGST 120

HM 107 NDDGYILVDSPOGN--ELAVDGGDQIRLTRESGS 138
 HS 121 ADAENFTTESIKGNADVLEQSDRIKIVMDAAS 154

HM 139-321 Нет заметной гомологии.

HM 322 CLTGTDFATGP-GNEIQLVNEDYN----AGGGVGTLLNVAIKSGADQINMEETTITTTIGPDGNTNLTYSDDGATED-QTEFAVESIQDDDSL PVMTDSDRFRVVIDPGTLET-----G 430
 HS 47 GSATGEEASAQVSNRINIVSAYGNVKTASGTDIVDYANLTVRQAAGADNINLSKSTIQWIGPDTATTLTY--DGSTADAENFTTESIKGNADV-LVEQSDRIKIVMDAASITNGLKAG 163

HM 431 ETMTLEVTTESGATTEIRISVPNTLAGESAV 461
 HS 164 EEVQLTVTTQYSGKTTYWANVPEESLKDKNAV 194

Б

Рисунок 21. Гомология флагеллинов. А) Выравнивание последовательностей FlaA2- и FlaB-флагеллинов *H. marismortui*. Б) Выравнивание последовательностей FlaA2 *H. marismortui* (Hm) и FlgA1 *H. salinarum* (Hs).

6. 4. Обнаружение гетерогенности FlaB-флагеллина в составе филаментов

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 22А). 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 22Б). 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-r (устойчивая) и FlaB-s (чувствительная).

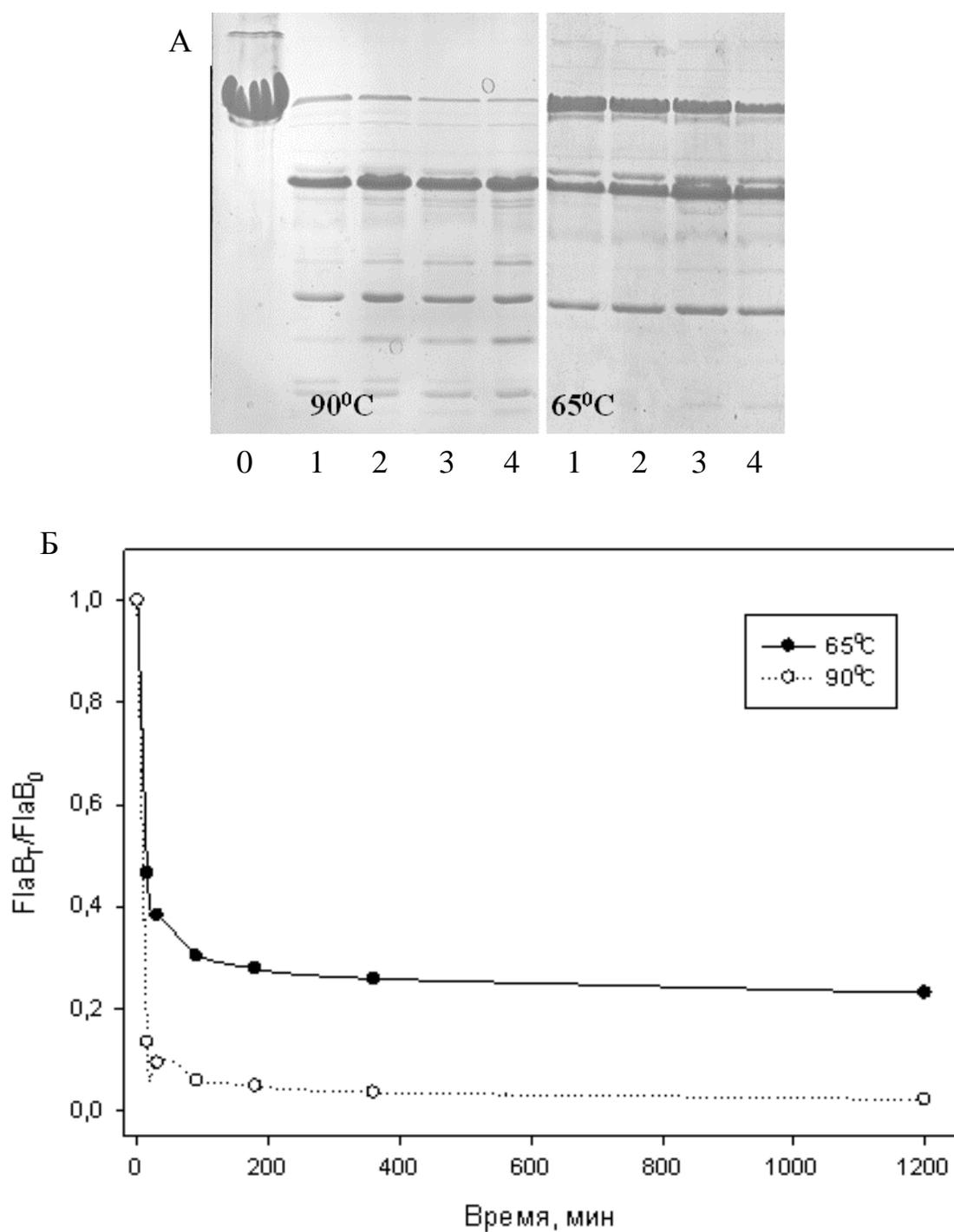


Рисунок 22. Временная зависимость трипсинолиза FlaB-филаментов *H. marismortui* после прогрева до 90 °С и 65 °С: (А) - Электрофореграмма препаратов филаментов до трипсинолиза (0), через 15, 30, 180 и 1200 мин после начала трипсинолиза (1-4, соответственно). (Б) – Изменение относительного содержания интактного 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 23 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.

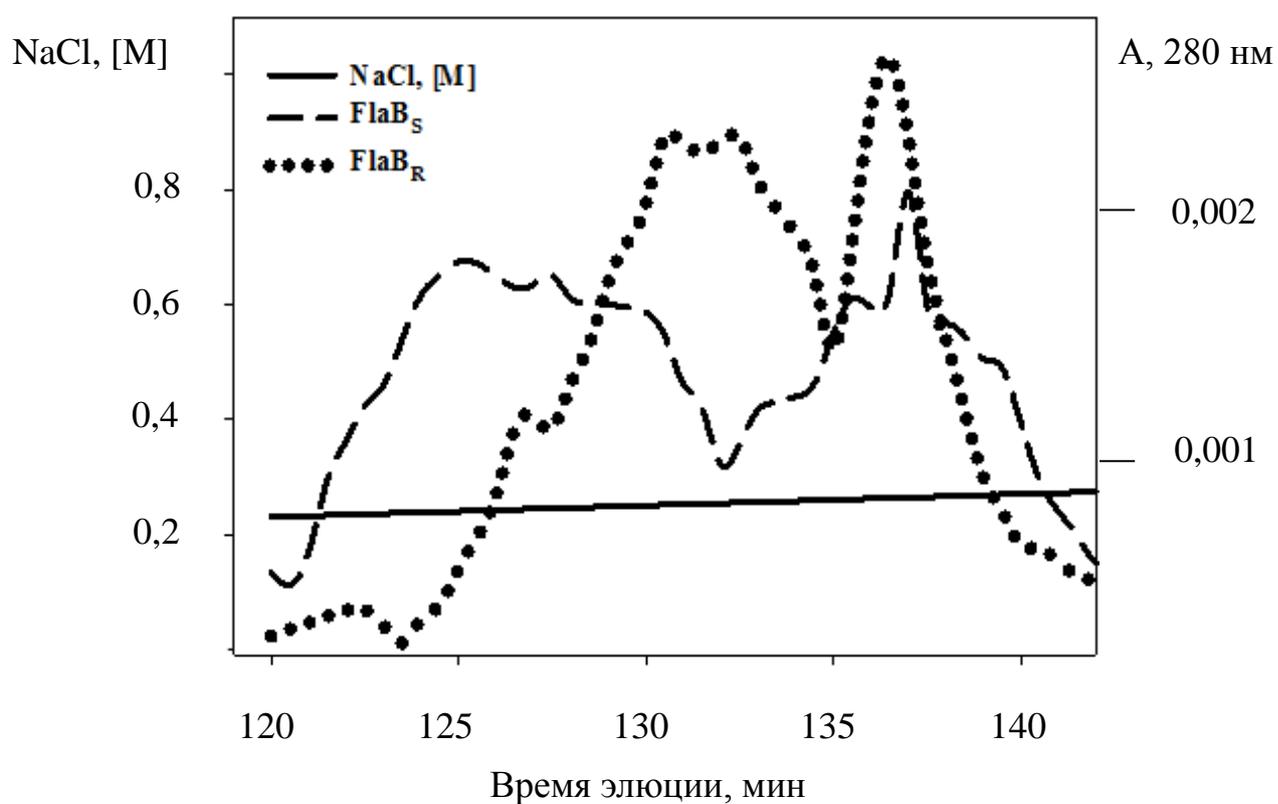


Рисунок 23. Профили элюции препаратов двух форм FlaV-флагеллина *H. marismortui*, полученные при фракционировании на анионообменной колонке monoQ в 10 mM Трис-НСl буфере (рН 9), содержащем 1% Тритон X-100 и 8M мочевины.

6. 5. 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 24). В качестве отрицательного контроля использовался БСА, а в качестве положительного – жгутики *H. salinarum* (Wieland et al., 1985). 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 СНN-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 (Valliere-Douglass et al., 2010), но для архей подобные случаи пока не описаны.

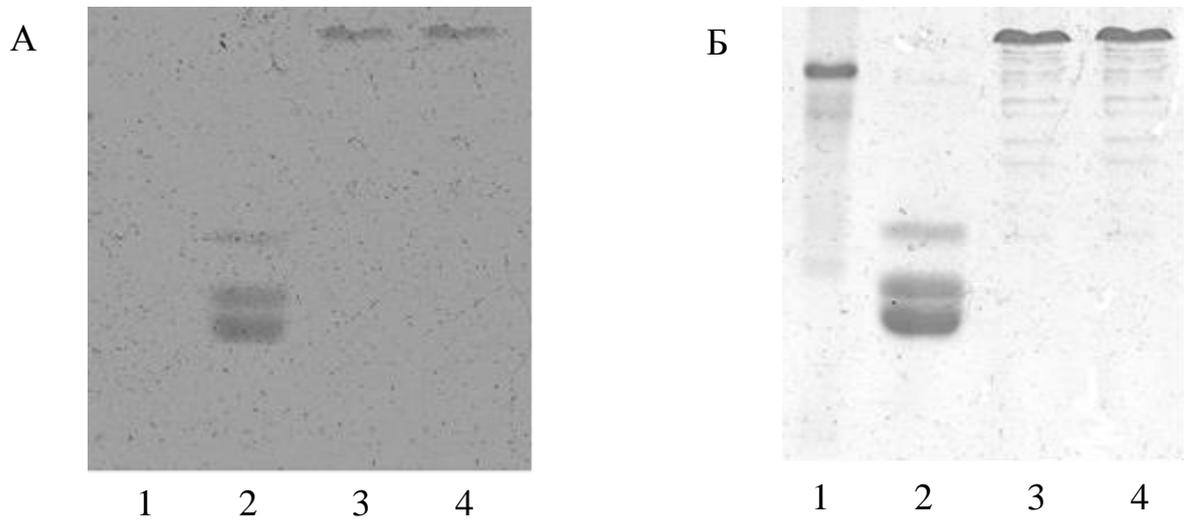


Рисунок 24. Электрофореграммы препаратов жгутиков *H. marismortui*. Окрашивание реагентом Шиффа (А) и кумасси R-250 (Б). Трек: 1) БСА; 2) жгутики *H. salinarum*; 3) FlaA2; 4) FlaB.

6. 6. Выделение структурного домена FlaB-флагеллина *H. marismortui*

Как было сказано выше, при прогреве FlaB-жгутиков до температуры, соответствующей плавлению первого пика теплопоглощения, они теряли свою устойчивость к трипсинолизу, при этом образовывался набор протеолитических фрагментов. Используя гель-фильтрацию нам удалось выделить в чистом виде крупный триптический фрагмент FlaB-флагеллина, образующийся при протеолизе частично денатурированных филаментов (рисунок 25). В случае FlaA2-жгутиков частичная денатурация флагеллинов сопровождается агрегацией, что осложняет получение аналогичного фрагмента. По данным гель-фильтрации, молекулярный вес TFB-фрагмента составляет приблизительно 30 кДа. При концентрациях соли 10% и выше TFB-фрагмент все еще интегрирован в полимерные структуры, при концентрациях 7-8% фрагмент переходит в мономерную форму, сохраняя структурную целостность. Микрокалориметрические исследования показали, что при концентрациях NaCl выше 7% данный фрагмент сохраняет третичную структуру и плавится как одна структурная единица. При переводе в 20% солевой раствор термостабильность TFB-фрагмента возрастает, но остается ниже, чем в составе жгутиков, что может указывать на дополнительную стабилизацию структуры в полимере за счет кооперативных взаимодействий. Микрокалориметрический анализ данного фрагмента показал наличие единственного пика теплопоглощения (рисунок 26), что говорит о том, что в составе данного фрагмента содержится один из структурных доменов FlaB-флагеллина. Так как плавление флагеллиновых доменов носит необратимый характер, можно сделать вывод, что данный пик теплопоглощения соответствует плавлению второго пика в составе FlaB-жгутиков.

С помощью N-концевого секвенирования и масс-спектрометрии нам удалось установить, что данный фрагмент включает в себя центральную и C-концевые части молекулы флагеллина и соответствует 175-454 аминокислотным остаткам FlaB-флагеллина. Рассчитанный молекулярный вес составил 28,98 кДа,

что согласуется с данными гель фильтрации (~30 кДа). К сожалению, нам не удалось выделить сходный структурный домен FlaA2-флагеллина, так как его продукты трипинолиза сильно агрегируют. Однако, исходя из схожести картин плавления и протеолиза, мы полагаем что FlaA2- и FlaB-флагеллины имеют схожую доменную организацию.

Данный результат интересен тем, что в настоящее время отсутствуют данные по пространственной структуре архейных флагеллинов. Одной из основных проблем при выяснении детальной структуры флагеллинов и других полимеризующихся белков являются сложности, возникающие при попытках их кристаллизации. До настоящего времени архейные флагеллины и их фрагменты в виде мономеров удавалось получить только в условиях, которые приводят к их необратимой денатурации. TFB-фрагмент является первым известным исключением из этого правила. Мы планируем использовать его для кристаллизации и последующего определения трехмерной структуры.

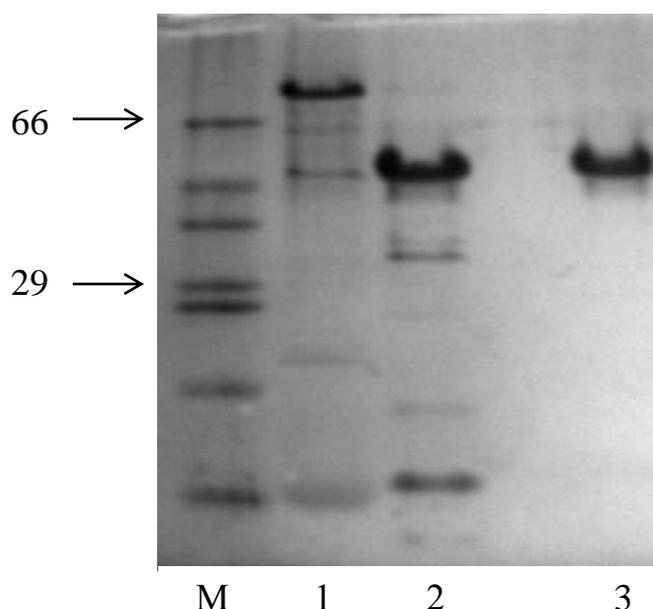


Рисунок 25. Выделение и очистка триптического фрагмента FlaB-флагеллина *H. marismortui* (TFB). Треки: 1) Осадок и 2) Супернатант после высокоскоростного центрифугирования продуктов частичного протеолиза FlaB-флагеллина *H. marismortui*; 3) Триптический фрагмент FlaB-флагеллина, очищенный с помощью гель-фильтрации. М – маркер (кДа). Результаты получены совместно с М. Г. Пятибратовым.

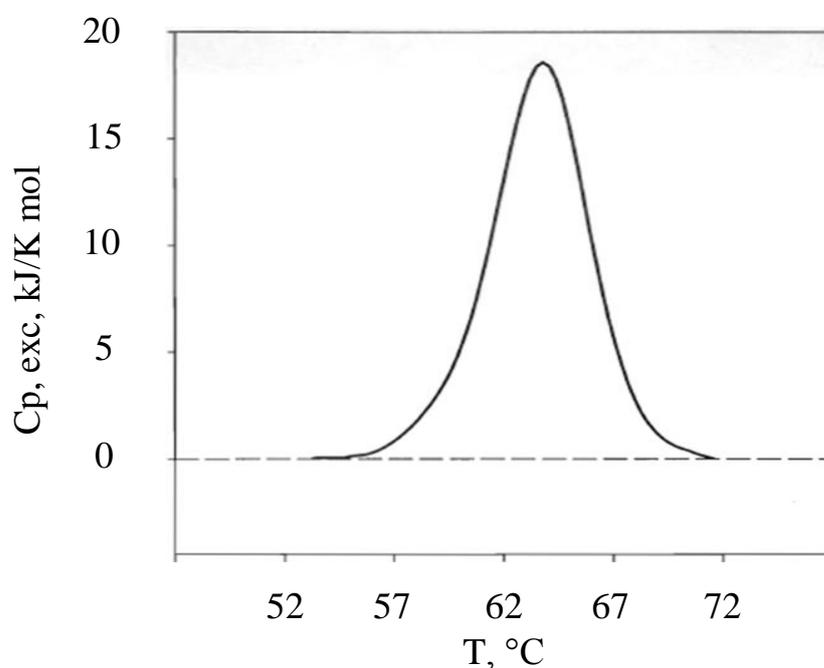


Рисунок 26. Кривая плавления триптического фрагмента FlaB-флагеллина *H. marismortui*. результаты получены совместно с Е. И. Тиктопуло.

6. 7. Роль избыточности по генам флагеллинов у *H. marismortui*.

Исследование аппарата подвижности *H. marismortui* показало, что спиральный и функциональный жгутик данного организма может строиться исключительно из субъединиц FlaB-флагеллина. Таким образом, была непонятна биологическая роль второго гена флагеллина (*flaA2*), расположенного на плазмиде.

В этой связи нас заинтересовали работы, в которых исследовалась роль множественности генов 16S рРНК у *H. marismortui*. Геном данного организма содержит три гена 16S рРНК (*rrnA*, *rrnB* и *rrnC*) (Baliga et al., 2004), причем гены *rrnA* и *rrnC* практически идентичны, а *rrnB* значительно от них отличался по нуклеотидной последовательности. Проведенные исследования показали, что ген *rrnB* не является жизненно необходимым (Tu et al., 2005) и, таким образом, геном *H. marismortui* имел избыточность по генам 16S рРНК. Исследование роли данной избыточности показало, что наличие гена *rrnB* является механизмом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды, в частности к изменению температуры (Lopez-Lopez et al., 2007). В данной работе авторы показали, что с увеличением температуры культивирования уровень транскрипции *rrnB*-гена возрастал и его продукт замещал продукты генов *rrnA/C*. Теоретический анализ показал, что *rrnB* 16S рРНК обладала более высокой термостабильностью и, таким образом, наличие гена *rrnB* увеличивало норму реакции данного организма. Для таких генов, продукты которых выполняют одну и ту же функцию при различных условиях окружающей среды был предложен термин экопаралогии (Sanchez-Perez et al., 2008). Дальнейший анализ показал, что геном *H. marismortui* имеет значительный уровень избыточности – порядка ста генов были предложены в качестве возможных кандидатов в экопаралогии (Sanchez-Perez et al., 2008). Надо так же сказать, что гены флагеллинов *H. marismortui* не попали в данный список, возможно из-за того, что множественность флагеллиновых генов широко распространена среди архей. Данные факты навели нас на мысль, что и в нашем

случае множественность флагеллиновых генов может являться механизмом адаптации, косвенным подтверждением чего являлся тот факт, что по данным сканирующей микрокалориметрии жгутики, построенные из FlaA2-флагеллина, были существенно более термостабильны чем жгутики, построенные из FlaB-флагеллина.

Известно, что стабильность галофильных белков зависит от солености среды. Для проверки нашего предположения о том, что избыточность по генам флагеллинов *N. marismortui* является механизмом адаптации, мы проверили подвижность FlaA2- и FlaB-штаммов на полужидкой агаризованной среде при различных значениях температур (40 °C и 50 °C) и соленостей (20%, 25% и 30%). В условиях 20% солености и 50 °C оба штамма не росли, результаты остальных экспериментов приведены на рисунке 27. Как видно из полученных результатов, клетки FlaB-штамма, в сравнении с клетками FlaA2-штамма, при повышении температуры или уменьшении солености легче теряют подвижность. Однако при повышении концентрации соли подвижность клеток FlaB-штамма восстанавливалась. Интересен тот факт, что при 30% соли и 40 °C подвижность клеток FlaB-штамма оказалась заметно выше подвижности клеток FlaA2-штамма.

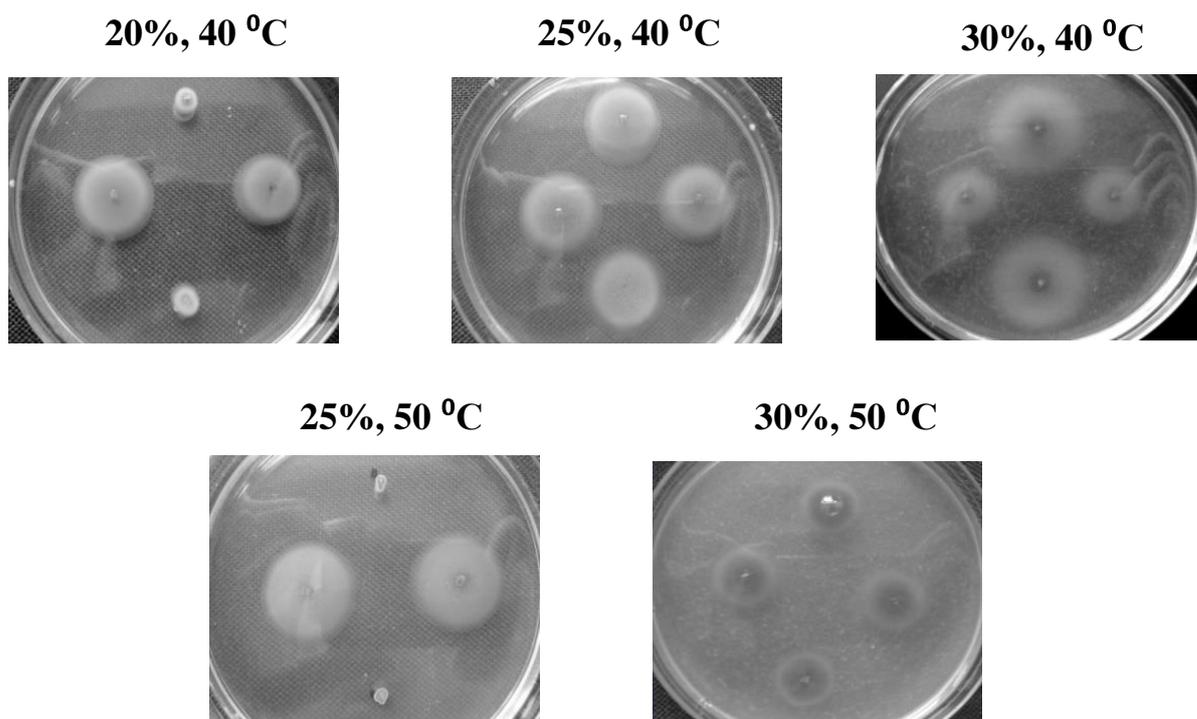


Рисунок 27. Подвижность FlaA2 и FlaB штаммов при различных значениях соленостей (%) и температур (°C). Пятна FlaA2 штамма слева и справа, FlaB – сверху и снизу.

Мы предполагаем, что сниженная подвижность клеток FlaB-штамма при условиях низкой соли/высокой температуры вызвана нарушением сборки жгутиков из FlaB-флагеллина. Для проверки данного предположения мы провели выделение жгутиков из клеток, росших при тех же самых условиях в жидкой среде. Полученные препараты были проанализированы с помощью ДСН-ПААГ (рисунок 28). Как видно из приведенных результатов, в условиях, когда клетки FlaB-штамма неподвижны на полужидкой агаризованной среде, из клеточной суспензии так же не выделяются жгутики. Неожиданным результатом оказалось то, что в условиях, когда подвижность клеток обоих штаммов на полужидкой агаризованной среде была сравнима, из культур, росших в жидкой среде, выход FlaB-жгутиков был существенно ниже выхода FlaA2 жгутиков (25% соли и 40 °C) или же вовсе отсутствовал (30% соли и 50 °C). Этот результат может указывать на

то, что гены флагеллинов при росте клеток в жидкой и на полужидкой средах регулируются по-разному. Данный вопрос требует дальнейшего изучения.

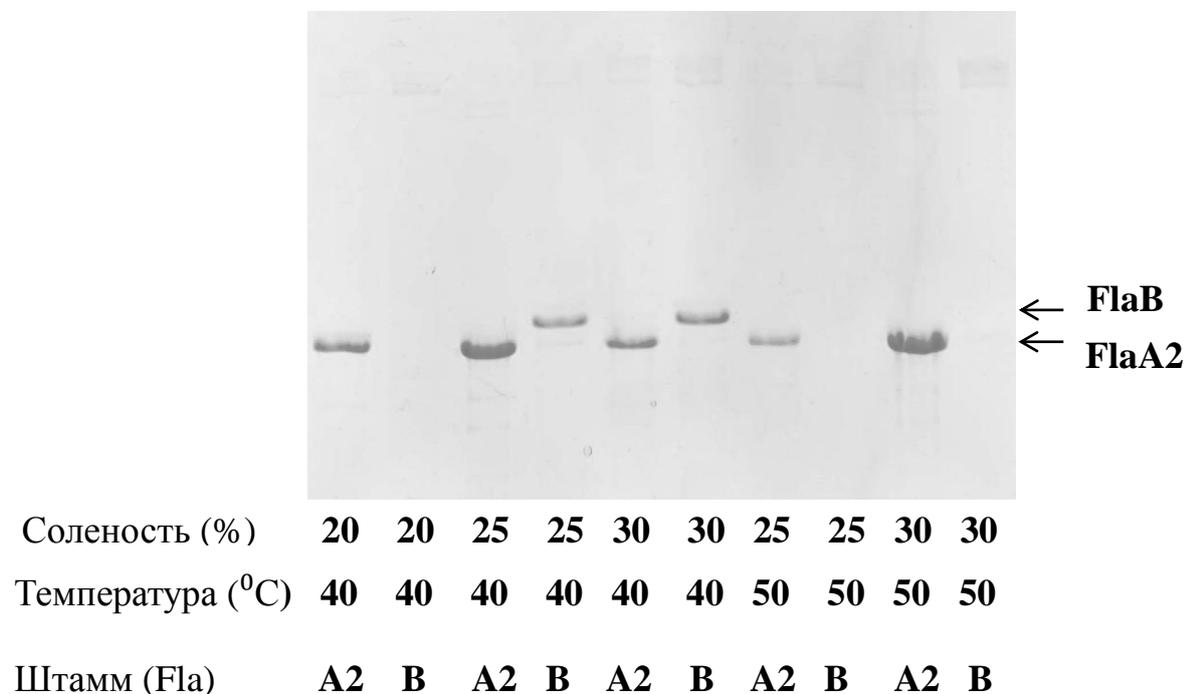


Рисунок 28. Электрофореграмма жгутиков, выделенных из суспензии FlaA2- и FlaB-штаммов, выросших при различных условиях.

Как нами было показано ранее, в препаратах жгутиков, выделенных из FlaA2-штамма, присутствует минорное количество FlaB-флагеллина, которое можно обнаружить с помощью иммуноблоттинга. Препараты жгутиков, выделенные из клеток FlaA2-штамма росших при разных условиях, были проверены нами на наличие примеси FlaB-флагеллина (рисунок 29). Как видно, примесь FlaB-флагеллина не обнаруживалась в тех же условиях, при которых FlaB-жгутики не выделялись из клеток FlaB-штамма. Неясным оставался вопрос, является ли отсутствие FlaB-флагеллина результатом негативной регуляции его биосинтеза или же результатом того, что FlaB-флагеллин при определенных условиях не способен формировать жгутик. В группе профессора Родригеза-

Валеры (Университет Мигеля Эрнандеса, Испания) было показано, что уровень транскрипции FlaB-флагеллина в клетках FlaA2-штамма при 50 °C в 3 раза выше по сравнению с 27 °C (соленость среды в обоих случаях составляла 25%, персональное сообщение). С помощью иммуноблоттинга нами было показано что в препаратах жгутиков, выделенных из культуры FlaA2-штамма росшего при 27 °C, есть примесь FlaB-флагеллина, в то время как в препарате выделенном из культуры росшей при 50 °C она не детектировалась (рисунок 29, треки 7 и 5). Данный результат указывает на то, что отсутствие FlaB-флагеллина в препаратах жгутиков является результатом его неспособности формировать жгутик при высоких температурах/низкой солености, а не результатом подавления его биосинтеза.

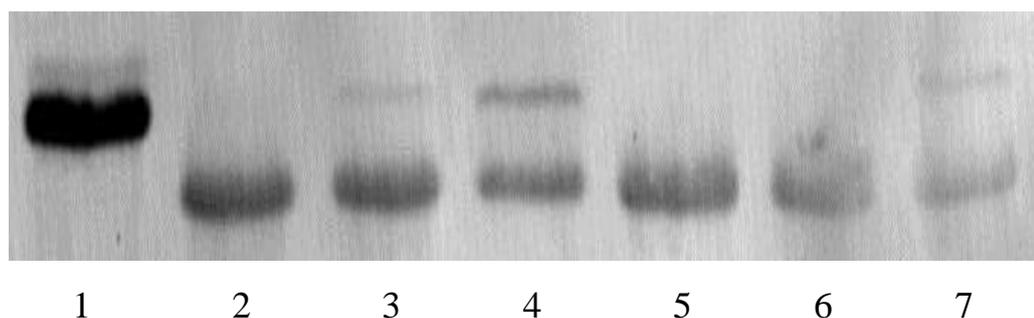


Рисунок 29. Иммуноблоттинг на предмет наличия FlaB-флагеллина в препаратах жгутиков, выделенных из культур *H. marismortui* выросших при разных условиях. Антитела получены против FlaB-филаментов.

Треки: 1) FlaB - 40 °C, 25%; 2) FlaA2 – 40 °C, 20%; 3) FlaA2 – 40 °C, 25%; 4) FlaA2 – 40 °C, 30%; 5) FlaA2 – 50 °C, 25%; 6) FlaA2 – 50 °C, 30%; 7) FlaA2 – 27 °C, 25%.

Полученные результаты позволили подтвердить наше предположение о том, что избыточность по генам флагеллинов *H. marismortui* является механизмом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды, а сами гены являются экопаралогами. Интересно то, что механизм реализации данной избыточности

отличается от описанного ранее для генов 16S рРНК *H. marismortui*, соотношение между продуктами которых постепенно менялось при изменении температуры культивирования (но не солености). В нашем случае есть две крайние ситуации – филамент строится только из FlaB- или же из FlaA2-флагеллина (иногда с ничтожной примесью FlaB-флагеллина).

Как уже было сказано выше (раздел 5. 1.), археон *H. marismortui* был выделен из Мервого моря, представляющего собой бессточное солевое озеро. Интересным свойством данного водоема является то, что в зимнее время над ним проходят обильные дожди, при этом соленость воды вблизи поверхности может значительно снижаться (Bodaker et al., 2010). Нить жгутика же, является внеклеточной структурой и, следовательно, в значительной степени подвержена колебаниям условий окружающей среды. В таких условиях (резкого снижения солености) селективное преимущество будет у клеток, имеющих плазмиду (FlaA2-штамм). При этом плазида pNG100, несущая ген FlaA2-флагеллина, по-видимому, выполняет роль своеобразного “переключателя”, определяя белковый состав нитей жгутиков, причем распространение данной плазмиды в популяции клеток может происходить за счет горизонтального переноса. В этой связи стоит отметить тот факт, что галофильные археи, как было показано в недавней работе, могут сливаться друг с другом с образованием как внутри- так и межвидовых гибридов, что значительно облегчает обмен ДНК между клетками (Williams et al., 2012).

6. 8. Биоинформатический анализ флагеллинов *H. marismortui*

С целью найти отличия, которые приводят к тому, что флагеллины *H. marismortui* оптимально работают при разных условиях внешней среды, был проведен теоретический анализ их аминокислотных последовательностей. Одной из характерных черт галофильных белков является пониженное значение их изоионных точек и преобладание кислых аминокислот над основными. В нашем случае видно, что FlaB-флагеллин является более кислым и таким образом более адаптированным к условиям высокой солености (таблица 2).

Одной из характеристик белка, связанной с его термостабильностью, является алифатический индекс (Икаі, 1980). Чем он выше, тем более термостабильным является белок. Однако в случае флагеллинов данный показатель оказался даже выше для FlaB флагеллина, что не согласовалось с данными по микрокалориметрии.

Таблица. 2. Сравнение алифатических индексов (AI) и зарядовых свойств FlaA2 и FlaB флагеллинов *H. marismortui*.

Флагеллин	AI (без сигнального пептида)	pI (без сигнального пептида)	(Asp+Glu)/(Arg+Lys)
FlaA2	83,84	3,61	5
FlaB	85,09	3,39	7,9

В недавних работах было показано, что неупорядоченные области белков играют важную роль в их адаптации к функционированию в жестких условиях окружающей среды (Nilsson et al., 2011; Pietrosemoli et al., 2013). С целью объяснить различие в термостабильности жгутиков, состоящих из FlaA2 и FlaB флагеллинов, мы провели теоретический анализ их аминокислотных последовательностей на наличие упорядоченных и неупорядоченных участков. Для более надежного предсказания неупорядоченных/подвижных участков белковой молекулы мы использовали два различных алгоритма предсказания, базирующихся на разных принципах (IsUnstruct и PONDR-FIT). Как видно на приведенных графиках (рисунок 30) обе программы дали схожие результаты, при этом наибольшее различие между флагеллинами наблюдается в области 250-300 аминокислотных остатков, у FlaA2 флагеллина, в отличие от FlaB, данный участок является неструктурированным.

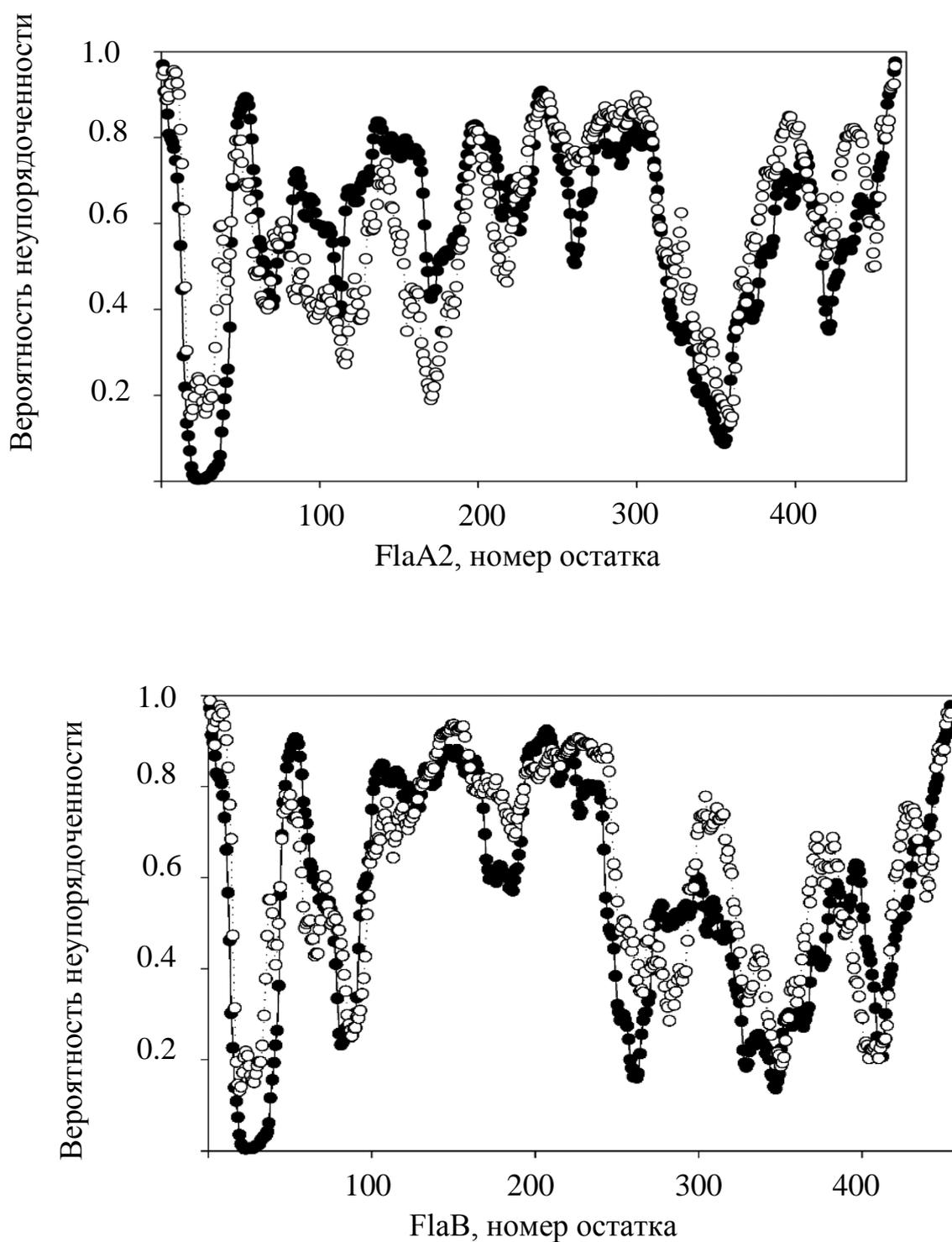


Рисунок 30. Анализ аминокислотных последовательностей FlaA2- и FlaB-флагеллинов *H. marismortui* на наличие упорядоченных и неупорядоченных участков, с помощью алгоритмов IsUnstruct (черные круги) и PONDR-FIT (белые круги). Результаты получены совместно с О. В. Галзитской.

Полученные результаты согласуются с тем фактом, что центральная область флагеллинов, является наиболее вариабельной областью данных белков. Как видно, мономер FlaA2-флагеллина является более гибким (75% остатков неупорядочены/гибки) в сравнении с мономером FlaB-флагеллина (63%). Сравнение аминокислотного состава флагеллинов показало, что наибольшее отличие между флагеллинами проявляется в количестве остатков глицина: 9,7% (44 остатка) для FlaB-флагеллина и 11,9% (55 остатков) для FlaA2. Мы полагаем, что именно данное отличие объясняет повышенную гибкость молекулы FlaA2-флагеллина, и именно остатки глицина позволяют молекуле флагеллина принять более компактную и устойчивую конформацию в составе филамента. Как уже говорилось выше, по данным сканирующей микрокалориметрии оба флагеллина имеют два пика теплопоглощения. Кроме того, даже при прогреве FlaA2 филаментов до 90 °С они сохраняли свою спиральную форму. Так же было показано, что прогрев FlaA2-филаментов до 75 °С и FlaB до 60 °С (кооперативное плавление первых пиков теплопоглощения) приводил к утрате ими устойчивости к воздействию трипсина. Эти данные указывают на то, что филаменты состоящие из FlaA2-флагеллина более стабильны, чем филаменты построенные из FlaB-флагеллина. Процесс, соответствующий первому пику теплопоглощения, аналогичен переходу глобулярного белка в состояние расплавленной глобулы (Ptitsyn, 1995), так как в данном состоянии открываются некоторые сайты для атаки протеазами. Второй пик теплопоглощения соответствует плавлению глобулярного домена TF-FlaB.

7. Исследование молекулярной организации жгутиков

Halorubrum lacusprofundi

7. 1. Изучение свойств жгутиков *H. 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. *H. lacusprofundi* является галофильным археоном, выделенным из гиперсоленого Глубокого озера (Deer Lake) в Антарктиде. По первоначальному описанию (Franzmann et al., 1988) данный организм является неподвижным и не синтезирует жгутики, при этом в геноме присутствует полный набор *fla*-ассоциированных генов, а так же единственный ген флагеллина (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1202>). Предполагаемый белковый продукт гена флагеллина (*flaB*) имел размер 243 аминокислотных остатка и содержал сигнальный пептид.

Полученная нами из коллекции культура данного археона была подвергнута нескольким раундам селекции на полужидкой агаризованной среде (0,19% агар), в результате чего нам удалось получить клетки, обладающие заметным уровнем подвижности. Из данных клеток были выделены жгутики по стандартной методике. Электрофорез жгутиков *H. lacusprofundi* в ДСН-ПААГ

показал наличие белковой полосы с подвижностью около 50 кДа, кроме того присутствовала дополнительная полоса димера (что является характерной чертой архейных флагеллинов). С помощью масс-спектрометрии мы идентифицировали данный белок как продукт *flaB* гена флагеллина *H. lacusprofundi*. Электронная микроскопия препаратов жгутиков показала, что большая часть филаментов имеет отчетливую спиральную форму. При этом наблюдался полиморфизм, проявляющийся в виде различной амплитуды и шаге спиралей, а также наличии кольцевых форм (рисунок 31). Толщина филаментов составляла 10-11 нм.

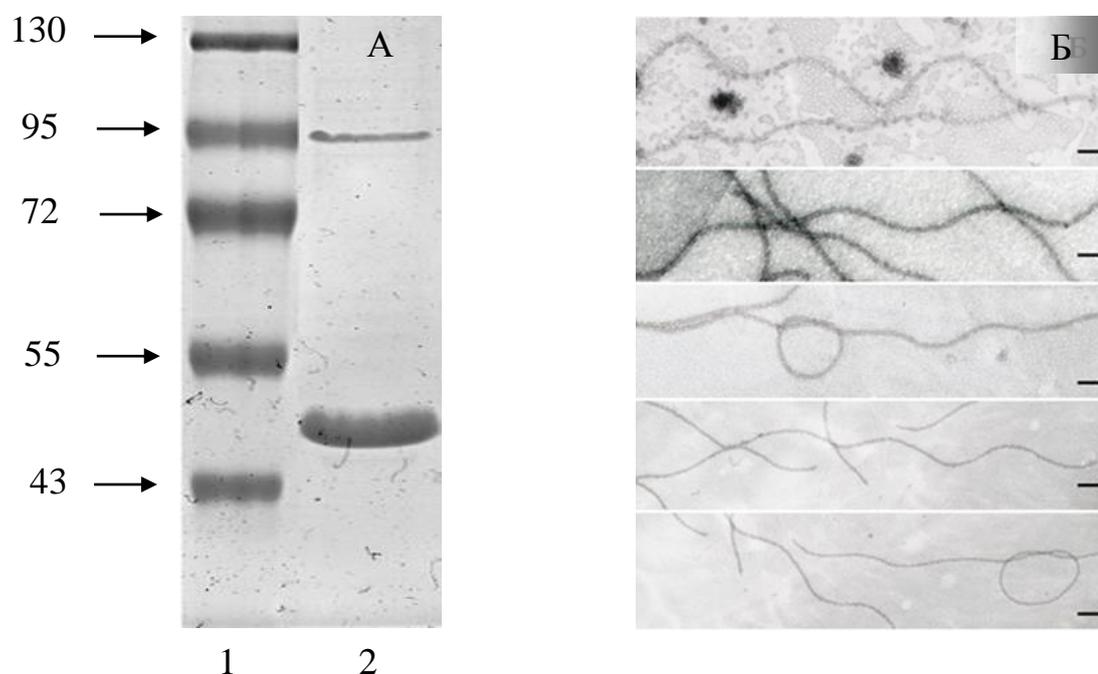


Рисунок 31. Филаменты *H. lacusprofundi*:

А) Электрофорез в ДСН-ПААГ: 1) белковые маркеры (кДа); 2) препарат филаментов; Б) Электронно-микроскопические фотографии филаментов. Масштабная линейка 100 нм. Результаты получены совместно с С. Н. Безносовым.

Дальнейшее изучение филаментов *H. lacusprofundi* с использованием анионообменной хроматографии позволило, как и в случае с *H. marismortui*, выделить несколько форм флагеллина, отличающихся своими зарядовыми характеристиками. Профиль элюции флагеллина, полученного диссоциацией филаментов *H. lacusprofundi*, приведен на рисунке 32. Как видно из приведенных результатов, филаменты содержат как минимум две мажорные формы флагеллина. Относительное содержание форм флагеллина в составе филаментов оценивалось по сравнению площадей пиков на хроматограммах. На долю основной формы флагеллина (правый пик) приходится около 40% от суммарного белка.

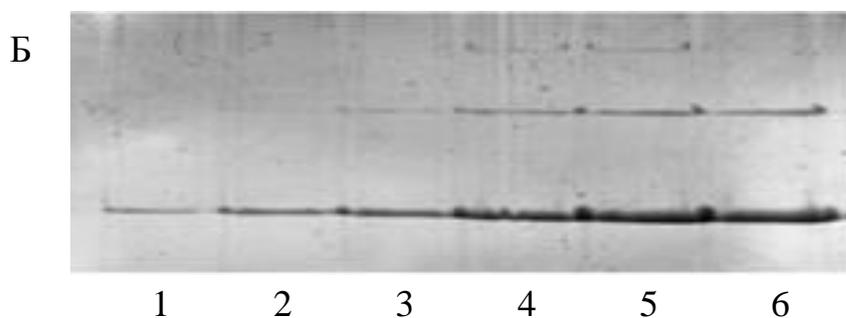
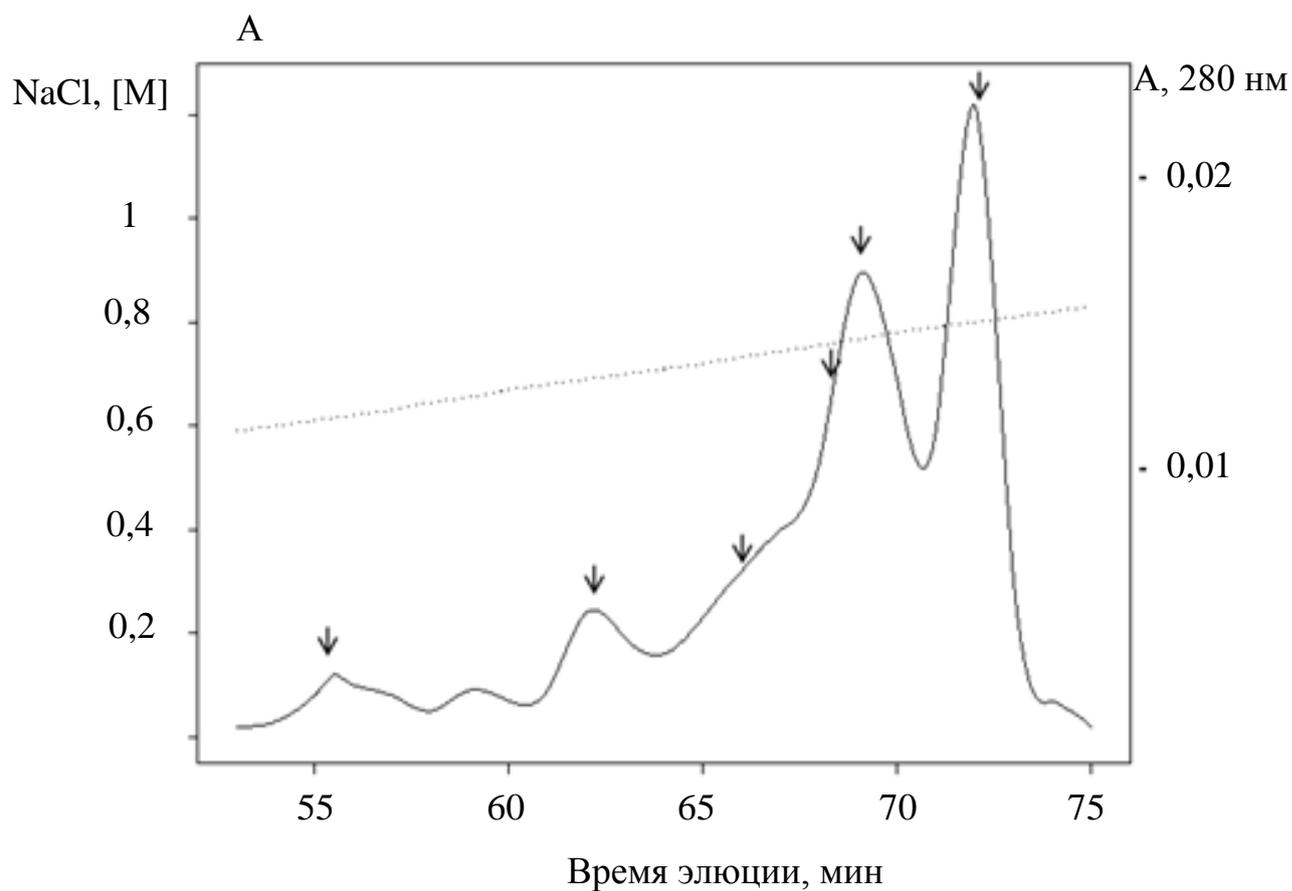


Рисунок 32. Гетерогенность флагеллина *H. lacusprofundi*.

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

Мы предположили, что причиной данной гетерогенности флагеллина может являться наличие посттрансляционных модификаций. В отличие от флагеллинов *H. marismortui*, флагеллин *H. lacusprofundi* содержит 6 канонических сайтов для N-гликозилирования. Окрашивание данного белка реагентом Шиффа дало положительный результат, при этом данное окрашивание было достаточно стабильно (рисунок 33).

Таким образом, данный результат является дополнительным подтверждением того, что спиральные филаменты жгутиков галофильных архей могут строиться из единственного флагеллина, и обнаруженный нами для *H. marismortui* принцип не является уникальным.

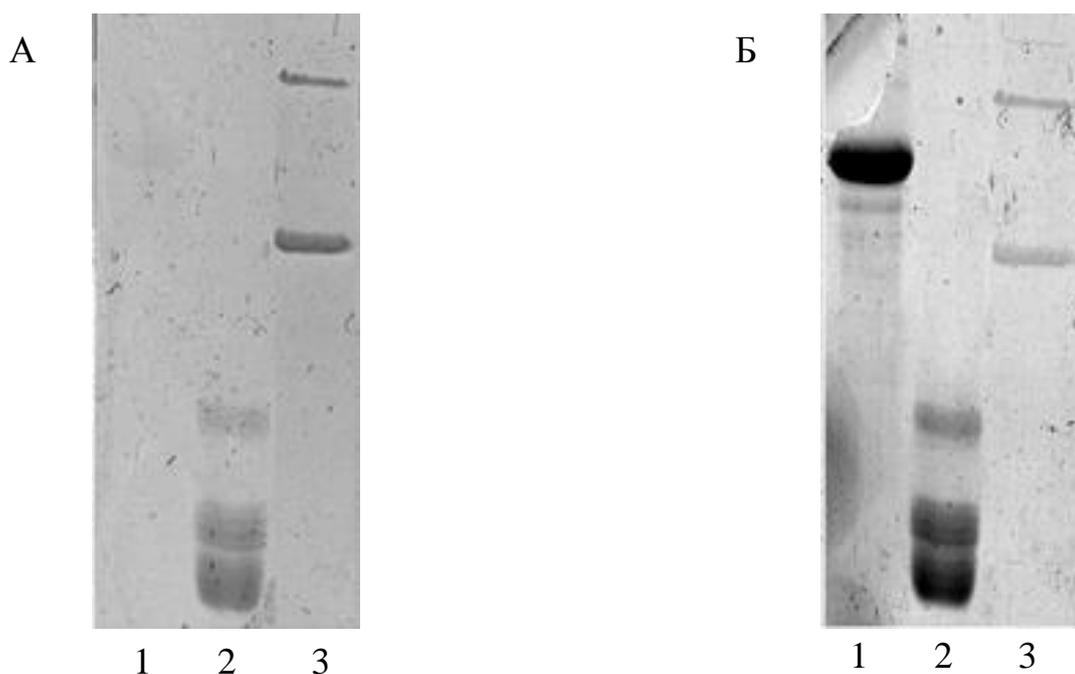


Рисунок 33. Электрофореграммы препаратов жгутиков *H. lacusprofundi*. Окрашивание реагентом Шиффа (А) и кумасси R-250 (Б). Трек: 1) БСА; 2) жгутики *H. salinarum*; 3) жгутики *H. lacusprofundi*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как было сказано в разделе «Обзор литературы», 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 репликациях, 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 посттрансляционных 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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Бакеева, Л. Е., Метлина, А. Л., Новикова, Т. М., Сперанский, В. В. (1992). Ультраструктура двигательного аппарата *Halobacterium salinarium*. *Доклады академии наук*, **326**. С. 914-915.
- 2) Безносков, С. Н., Пятибратов, М. Г., Федоров, О. В. (2007). О мультикомпонентности жгутиков *Halobacterium salinarium*. *Микробиология*, **76**. С. 494-501.
- 3) Воробьева, Л. И. (2007). *Археи*. - М.: ИКЦ «Академкнига». – 447 с.
- 4) Метлина, А. Л. (2001). Жгутики прокариот как система биологической подвижности. *Успехи биологической химии*. **41**. С. 229-282.
- 5) Метлина, А. Л. (2004). Жгутики бактерий и архей как органеллы подвижности прокариот. *Биохимия*. **69**. С. 1477-1488.
- 6) Остерман, Л. А. (1981). *Электрофорез и ультрацентрифугирование*. - Москва: Наука. – 288 с.
- 7) Пиневиц, А. В. (2007). *Микробиология. Биология прокариотов*. - СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та. – 331 с.
- 8) Пятибратов, М. Г., Костюкова, А. С., Тарасов, В. Ю., Федоров, О. В. (1996). О некоторых принципах формирования структуры жгутиков галоалкалофильных архей. *Биохимия*, **61**. С. 1489-1497.
- 9) Тарасов, В. Ю., Пятибратов, М. Г., Безносков, С. Н., Федоров, О. В. (2004). О надмолекулярной организации филаменты жгутиков архей. *Доклады Академии наук*, **396**. С. 835-837.
- 10) Шлегель, Г. (1987). *Общая микробиология*. – М.: Мир. – 567 с.
- 11) Aizawa, S. I. (1996). Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.*, **19**. P. 1–5.

- 12) Ajon, M., Frols, S., van Wolferen, M., Stoecker, K., Teichmann, D., Driessen, A. J., Grogan, D. W., Albers, S. V., Schleper, C. (2011). UV-inducible DNA exchange in hyperthermophilic archaea mediated by type IV pili. *Mol. Microbiol.*, **82**. P. 807–817.
- 13) Alam, M. and Oesterhelt, D. (1984). Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *J. Mol. Biol.*, **176**. P. 459-475.
- 14) Albers, S. V., Elferink, M. G., Charlebois, R. L., Sensen, C. W., Driessen, A. J. M., Konings, W. N. (1999). Glucose transport in the extremely thermoacidophilic *Sulfolobus solfataricus* involves a high-affinity membrane-integrated binding protein. *J. Bacteriol.*, **181**. P. 4285–4291.
- 15) Albers, S. V., Szabo, Z., Driessen, A. J. M. (2003). Archaeal homolog of bacterial type IV prepilin signal peptidases with broad substrate specificity. *J. Bacteriol.*, **185**. P. 3918–3925.
- 16) Baliga, N. S., Bonneau, R., Facciotti, M. T., Pan, M., Glusman, G., Deutsch, E. W., Ng, W. V. (2004). Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea. *Genome Res.*, **14**. P. 2221-2234.
- 17) Banerjee, A., Ghosh, A., Mills, D. J., Kahnt, J., Vonck, J., Albers, S. V. (2012). FlaX, a unique component of the crenarchaeal archaellum, forms oligomeric ring-shaped structures and interacts with the motor ATPase FlaI. *J. Biol. Chem.*, **287**. P. 43322–43330.
- 18) Banerjee, A., Neiner, T., Tripp, P., Albers, S. V. (2013). Insights into subunit interactions in the *Sulfolobus acidocaldarius* archaellum cytoplasmic complex. *FEBS J.*, **280**. P. 6141-6149.
- 19) Bardy, S. L. and Jarrell, K. F. (2002). FlaK of the archaeon *Methanococcus maripaludis* possesses preflagellin peptidase activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, **208**. P. 53–59.

- 20) Bardy, S. L. and Jarrell, K. F. (2003). Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol. Microbiol.*, **50**. P. 1339–1347.
- 21) Bardy, S. L., Ng, S. Y., Jarrell, K. F. (2003a). Prokaryotic motility structures. *Microbiology*, **149**. P. 295-304.
- 22) Bardy, S. L., Eichler, J., Jarrell, K. F. (2003b). Archaeal signal peptides—a comparative survey at the genome level. *Protein Sci.*, **12**. P. 1833–1843.
- 23) Berg, H. C. and Anderson, R. A. (1973). Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature*, **245**. P. 380–382.
- 24) Beznosov, S. N., Pyatibratov, M. G., Veluri, P. S., Mitra, S., Fedorov, O. V. (2013). A way to identify archaeellins in *Halobacterium salinarum* archaeella by FLAG-tagging. *Cent. Eur. J. Biol.*, **8**. P. 828-834.
- 25) Bodaker, I., Sharon, I., Suzuki, M. T., Feingersch, R., Shmoish, M., Andreishcheva, E., Sogin, M. L., Rosenberg, M., Maguire, M. E., Belkin, S., Oren, A., Beja, O. (2010). Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment. *ISME J.*, **4**. P. 399–407.
- 26) Calladine, C. R. (1978). Change of waveform in bacterial flagella: the role of mechanics at the molecular level. *J. Mol. Biol.*, **118**. P. 457-479.
- 27) Calo, D., Kaminski, L., Eichler, J. (2010). Protein glycosylation in Archaea: sweet and extreme. *Glycobiology*, **20**. P. 1065-1076.
- 28) Chaban, B., Voisin, S., Kelly, J., Logan, S. M., Jarrell, K. F. (2006). Identification of genes involved in the biosynthesis and attachment of *Methanococcus voltae* N-linked glycans: insight into N-linked glycosylation pathways in Archaea. *Mol. Microbiol.*, **61**. P. 259–268.

- 29) Chaban, B., Ng, S. Y., Kanbe, M., Saltzman, I., Nimmo, G., Aizawa, S. I., Jarrell, K. F. (2007). Systematic deletion analyses of the *fla* genes in the flagella operon identify several genes essential for proper assembly and function of flagella in the archaeon, *Methanococcus maripaludis*. *Mol. Microbiol.*, **66**. P. 596-609.
- 30) Chevance, F. F. V. and Hughes, K. T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Micro.*, **6**. P. 455–465.
- 31) Cohen-Krausz, S. and Trachtenberg, S. (2002). The structure of the archaeobacterial flagellar filament of the extreme halophile *Halobacterium salinarum* R1M1 and its relation to eubacterial flagellar filaments and type IV pili. *J. Mol. Biol.*, **321**. P. 383–395.
- 32) Cohen-Krausz, S. and Trachtenberg, S. (2008). The flagellar filament structure of the extreme acidothermophile *Sulfolobus shibatae* B12 suggests that archaeobacterial flagella have a unique and common symmetry and design. *J. Mol. Biol.*, **375**. P. 1113–1124.
- 33) Craig, L., Pique, M. E., Tainer, J. A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**. P. 363-378.
- 34) Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A. S., Pique, M. E., Yeager, M., Egelman, E. H., Tainer, J. A. (2006). Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Molec. Cell.*, **23**. P. 651-662.
- 35) Craig, L. and Li, J. (2008). Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **18**. P. 267-277.
- 36) Crowther, L. J., Anantha, R. P., Donnenberg, M. S. (2004). The inner membrane subassembly of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle forming pilus. *Mol. Microbiol.*, **52**. P. 67-79.

- 37) Cruden, D., Sparling, R. and Markovetz, A. J. (1989). Isolation and ultrastructure of the flagella of *Methanococcus thermolithotrophicus* and *Methanospirillum hungatei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**. P. 1414-1419.
- 38) DePamphilis, M. L. and Adler, J. (1971a). Purification of intact flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **105**. P. 376–383.
- 39) DePamphilis, M. L. and Adler, J. (1971b). Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **105**. P. 384-395.
- 40) Doerner, K. C. and White, B. A. (1990). Detection of glycoproteins separated by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis using the periodic acid-Schiff stain. *Analytical biochemistry*, **187**. P. 147-150.
- 41) Dyll-Smith, M. (2001). *Protocols for halobacterial genetics (The Halohandbook)*, ed. 4.5. University of Melbourne, Melbourne, Australia.
- 42) Egelman, E. H. (2000). A robust algorithm for the reconstruction of helical filaments using single-particle methods. *Ultramicroscopy*, **85**. P. 225-234.
- 43) Elferink, M. G., Albers, S. V., Konings, W. N., Driessen, A. J. (2001). Sugar transport in *Sulfolobus solfataricus* is mediated by two families of binding protein-dependent ABC transporters. *Mol. Microbiol.*, **39**. P. 1494–1503.
- 44) Esquivel, R. N. and Pohlschroder M. (2014). A conserved type IV pilin signal peptide H-domain is critical for the post-translational regulation of flagella-dependent motility. *Mol. Microbiol.*, DOI: 10.1111/mmi.12673.
- 45) Evans, L. D., Poulter, S., Terentjev, E. M., Hughes, C., Fraser, G. M. (2013). A chain mechanism for flagellum growth. *Nature*, **504**. P. 287-290.
- 46) Faulds-Pain, A., Birchall, C., Aldridge, C., Smith, W. D., Grimaldi, G., Nakamura, S., Aldridge, P. D. (2011). Flagellin redundancy in *Caulobacter*

- crenscentus* and its implications for flagellar filament assembly. *J. Bacteriol.*, **193**. P. 2695-2707.
- 47) Franzmann, P. D., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, J. K., Cameron, D. E., Stevenson, P. L., Burton, H. R. (1988). *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. *Syst. Appl. Microbiol.*, **11**. P. 20-27.
- 48) Freitag, N. E., Seifert, H. S., Koomey, M. (1995). Characterization of the *pilF-pilD* pilus-assembly locus of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.*, **16**. P. 575-586.
- 49) Frols, S., Ajon, M., Wagner, M., Teichmann, D., Zolghadr, B., Folea, M., Boekema, E. J., Driessen, A. J., Schleper, C., Albers, S. V. (2008). UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Mol. Microbiol.*, **70**. P. 938–952.
- 50) Galkin, V. E., Yu, X., Bielnicki, J., Heuser, J., Ewing, C. P., Guerry, P., Egelman, E. H. (2008). Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments. *Science*, **320**. P. 382-385.
- 51) Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The proteomics protocols handbook* (P. 571-607). Humana Press.
- 52) Gerl, L., Deutzmann, R., Sumper, M. (1989). Halobacterial flagellins are encoded by a multigene family. *FEBS Lett.*, **244**. P. 137-140.
- 53) Ghosh, A. and Albers, S. V. (2011). Assembly and function of the archaeal flagellum. *Biochem. Soc. Trans.*, **39**. P. 64–69.
- 54) Ghosh, A., Hartung, S., van der Does, C., Tainer, J. A., Albers, S. V. (2011). Archaeal flagellar ATPase motor shows ATP-dependent hexameric assembly and activity stimulation by specific lipid binding. *Biochem. J.*, **437**. P. 43–52.

- 55) Guan, Z., Naparstek, S., Calo, D., Eichler, J. (2012). Protein glycosylation as an adaptive response in Archaea: growth at different salt concentrations leads to alterations in *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein N-glycosylation. *Environ. Microbiol.*, **14**. P. 743-753.
- 56) Hendrickson, E. L., Liu, Y., Rosas-Sandoval, G., Porat, I., Soll, D., Whitman, W. B., Leigh, J. A. (2008). Global responses of *Methanococcus maripaludis* to specific nutrient limitations and growth rate. *J. Bacteriol.*, **190**. P. 2198–2205.
- 57) Hansen, J. K. and Forest, K. (2006). Type IV pilin structures: Insights on shared architecture, fiber assembly, receptor binding and Type II secretion. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.*, **11**. P. 192-207.
- 58) Herzog, B. and Wirth, R. (2012). Swimming behavior of selected species of Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**. P. 1670-1674.
- 59) Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K., Aizawa, S. (1994). Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **176**. P. 5439–5449.
- 60) Homma, M., DeRosier, D. J., Macnab, R. M. (1990). Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *J. Mol. Biol.*, **213**. P. 819–832.
- 61) Hu, J., Xue, Y., Lee, S., Ha, Y. (2011). The crystal structure of GxGD membrane protease FlaK. *Nature*, **475**. P. 528–531.
- 62) Hughes, K. T., Gillen, K. L., Semon, M.J., Karlinsey, J. E. (1993). Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science*, **262**. P. 1277–1280.
- 63) Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J. Biochem.*, **88**. P. 1895–1898.

- 64) Ikeda, J. S., Schmitt, C. K., Darnell, S. C., Watson, P. R., Bispham, J., Wallis, T. S. and O'Brien, A. D. (2001). Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis. *Infect. Immun.*, **69**. P. 3021–3030.
- 65) Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**. P. 23-28.
- 66) Jarrell, K. F. and Albers, S. V. (2012). The archaellum: an old motility structure with a new name. *Trends microbiol.*, **20**. P. 307-312.
- 67) Jarrell, K. F., Ding, Y., Nair, D. B., Siu, S. (2013). Surface appendages of archaea: structure, function, genetics and assembly. *Life*, **3**. P. 86-117.
- 68) Johnson, T. L., Abendroth, J., Hol, W. G., Sandkvist, M. (2006). Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol. Lett.*, **255**. P. 175-186.
- 69) Kalmokoff, M. L., Jarrell, K. F., Koval, S. F. (1988). Isolation of flagella from the archaeobacterium *Methanococcus voltae* by phase separation with Triton X-114. *J. Bacteriol.*, **170**. P. 1752-1758.
- 70) Kalmokoff, M. L., Karnauchow, T. M., Jarrell, K. F. (1990). Conserved N-terminal sequences in the flagellins of archaeobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**. P. 154–160.
- 71) Kalmokoff, M. L. and Jarrell, K. F. (1991). Cloning and sequencing of a multigene family encoding the flagellins of *Methanococcus voltae*. *J. Bacteriol.*, **173**. P. 7113–7125.
- 72) Kaufman, M. R., Shaw, C. E., Jones, I. D., Taylor, R. K. (1993). Biogenesis and regulation of the *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus: analogies to other virulence factor secretory systems. *Gene*, **126**. P. 43-49.

- 73) Kelly, J., Logan, S. M., Jarrell, K. F., Vandyke, D. J., Vinogradov, E. (2009). A novel N-linked flagellar glycan from *Methanococcus maripaludis*. *Carbohydr. Res.*, **344**. P. 648–653.
- 74) Kojima, S. and Blair, D. F. (2004). The bacterial flagellar motor: structure and function of a complex molecular machine. *Int. Rev. Cytol.*, **233**. P. 93–134.
- 75) Kupper, J., Marwan, W., Typke, D., Grunberg, H., Uwer, U., Gluch, M., Oesterhelt, D. (1994). The flagellar bundle of *Halobacterium salinarium* is inserted into a distinct polar cap structure. *J. Bacteriol.*, **176**. P. 5184-5187.
- 76) Lassak, K., Neiner, T., Ghosh, A., Klingl, A., Wirth, R., Albers, S. (2012). Molecular analysis of the crenarchaeal flagellum. *Mol. Microbiol.*, **83**. P. 110–124.
- 77) Lassak, K., Peeters, E., Wrobel, S., Albers, S. V. (2013). The one-component system ArnR: a membrane-bound activator of the crenarchaeal archaellum. *Mol. Microbiol.*, **88**. P. 125-139.
- 78) Lam, W. L. and Doolittle, W. F. (1989). Shuttle vectors for the archaebacterium *Halobacterium volcanii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**. P. 5478-5482.
- 79) Lewus, P. and Ford, R. M. (1999). Temperature-sensitive motility of *Sulfolobus acidocaldarius* influences population distribution in extreme environments. *J. Bacteriol.*, **181**. P. 4020-4025.
- 80) Li, J., Lim, M. S., Li, S., Brock, M., Pique, M. E., Woods, V. L. J., Craig, L. (2008). *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Structure*, **16**. P. 137-148.
- 81) Lobanov, M. Y., Galzitskaya, O. V. (2011). The Ising model for prediction of disordered residues from protein sequence alone. *Phys. Biol.*, 8(3), 035004.

- 82) Lobanov, M. Y., Sokolovskiy, I. V., Galzitskaya, O. V. (2013). IsUnstruct: prediction of the residue status to be ordered or disordered in the protein chain by a method based on the Ising model. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **31**. P. 1034-1043.
- 83) Lopez-Lopez, A., Benlloch, S., Bonfa, M., Rodriguez-Valera, F., Mira, A. (2007). Intragenomic 16S rDNA divergence in *Haloarcula marismortui* is an adaptation to different temperatures. *J. Mol. Evol.*, **65**. P. 687–696.
- 84) Macnab, R. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**. P. 77–100.
- 85) Maki-Yonekura, S., Yonekura, K., Namba, K. (2003). Domain movements of HAP2 in the cap-filament complex formation and growth process of the bacterial flagellum. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**. P. 15528–15533.
- 86) Matagne, A., Joris, B., Frere, J. M. (1991). Anomalous behavior of a protein during SDS/PAGE corrected by chemical modification of carboxylic groups. *Biochem. J.*, **280**. P. 553–556.
- 87) Mescher, M. F. and Strominger, J. L. (1976). Purification and characterization of a prokaryotic glucoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarium*. *J. Biol. Chem.*, **251**. P. 2005–2014.
- 88) Minamino, T., Macnab, R. M. (2000). FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol. Microbiol.*, **37**. P. 1494–1503.
- 89) Moissl, C., Rachel, R., Briegel, A., Engelhardt, H., Huber, R. (2005). The unique structure of archaeal 'hami', highly complex cell appendages with nano-grappling hooks. *Mol. Microbiol.*, **56**. P. 361–370.
- 90) Moissl-Eichinger, C. and Huber, H. (2011). Archaeal symbionts and parasites. *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**. P. 364–370.

- 91) Morimoto, Y. V. and Minamino, T. (2014). Structure and Function of the Bi-Directional Bacterial Flagellar Motor. *Biomolecules*, **4**. P. 217-234.
- 92) Mukhopadhyay, B., Johnson, E. F., Wolfe, R. S. (2000). A novel pH₂ control on the expression of flagella in the hyperthermophilic strictly hydrogenotrophic methanarchaeon *Methanococcus jannaschii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**. P. 11522–11527.
- 93) Muller, D. W., Meyer, C., Gurster, S., Kuper, U., Huber, H., Rachel, R., Wanner, G., Wirth, R., Bellack, A. (2009). The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis*: a new type of archaeal cell surface appendage. *J. Bacteriol.*, **191**. P. 6465–6468.
- 94) Namba, K. and Vonferviszt, F. (1997). Molecular architecture of bacterial flagellum. *Q. Rev. Biophys.* **30**. P. 1-65.
- 95) Nather, D. J., Rachel, R., Wanner, G., Wirth, R. (2006). Flagella of *Pyrococcus furiosus*: multifunctional organelles, made for swimming, adhesion to various surfaces, and cell-cell contacts. *J. Bacteriol.*, **188**. P. 6915-6923.
- 96) Ng, S. Y., Chaban, B., Jarrell, K. F. (2006). Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: a comparison of genes and posttranslational modifications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **11**. P. 167–191.
- 97) Nickell, S., Hegerl, R., Baumeister, W., Rachel, R. (2003). *Pyrodictium* cannulae enter the periplasmic space but do not enter the cytoplasm, as revealed by cryo-electron tomography. *J. Struct. Biol.*, **141**, P. 34–42.
- 98) Nilsson, J., Grahn, M., Wright, A. P. (2011). Proteome-wide evidence for enhanced positive Darwinian selection within intrinsically disordered regions in proteins. *Genome Biol.*, **12**. R65.
- 99) Oren, A., Ginzburg, M., Ginzburg, B. Z., Hochstein, L. I., Volcani, B. E. (1990). *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**. P. 209-210.

- 100) Parge, H. E., Forest, K. T., Hickey, M. J., Christensen, D. A., Getzoff, E. D., Tainer, J. A. (1995). Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6Å resolution. *Nature*, **378**. P. 32-38.
- 101) Patenge, N., Berendes, A., Engelhardt, H., Schuster, S.C., Oesterhelt, D. (2001). The *fla* gene cluster is involved in the biogenesis of flagella in *Halobacterium salinarum*. *Mol. Microbiol.*, **41**. P. 653–663.
- 102) Paul, K., Erhardt, M., Hirano, T., Blair, D. F, Hughes, K. T. (2008). Energy source of flagellar type III secretion. *Nature*, **451**. P. 489–492.
- 103) Peek, J. A. and Taylor, R. K. (1992). Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**. P. 6210-6214.
- 104) Perkins, D. N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M., Cottrell, J. C. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**. P. 3551-3567.
- 105) Pietrosevoli, N., García-Martín, J. A., Solano, R., Pazos, F. (2013). Genome-wide analysis of protein disorder in *Arabidopsis thaliana*: implications for plant environmental adaptation. *PloS one*, **8**. e55524.
- 106) Pohlschroder, M., Ghosh, A., Tripepi, M., Albers, S. V. (2011). Archaeal type IV pilus-like structures-evolutionarily conserved prokaryotic surface organelles. *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**. P. 1–7.
- 107) Privalov, P. L. and Potekhin, S. A. (1986). Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods. enzymol.*, **131**. P. 4-51.
- 108) Ptitsyn, O. B. (1995). Molten globule and protein folding. *Adv. Protein. Chem.*, **47**. P. 83–229.

- 109) Pyatibratov, M. G., Leonard, K., Tarasov, V. Y., Fedorov, O. V. (2002). Two immunologically distinct types of protofilaments can be identified in *Natrialba magadii* flagella. *FEMS Microbiol. Lett.*, **212**. P. 23-27.
- 110) Reimann, J., Lassak, K., Khadouma, S., Ettema, T. J., Yang, N., Driessen, A. J., Klingl, A., Albers, S. V. (2012). Regulation of archaella expression by the FHA and von Willebrand domain-containing proteins ArnA and ArnB in *Sulfolobus acidocaldarius*. *Mol. Microbiol.*, **86**. P. 24–36.
- 111) Reindl, S., Ghosh, A., Williams, G. J., Lassak, K., Neiner, T., Henche, A. L., Albers, S. V., Tainer, J. A. (2013). Insights into FlaI functions in archaeal motor assembly and motility from structures, conformations, and genetics. *Mol. Cell.*, **49**. P. 1069-1082.
- 112) Rieger, G., Rachel, R., Hermann, R., Stetter, K. O. (1995). Ultrastructure of the hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi*. *J. Struct. Biol.*, **115**. P. 78–87.
- 113) Ryu, W.S., Berry, R.M., Berg, H.C. (2000). Torque-generating units of the flagellar motor of *Escherichia coli* have a high duty ratio. *Nature*, **403**. P. 444-447.
- 114) Samatey, F. A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Namba, K. (2001). Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, **410**. P. 331–337.
- 115) Sanchez-Perez, G., Mira, A., Nyiro, G., Pasic, L., Rodriguez-Valera, F. (2008). Adapting to environmental changes using specialized paralogs. *Trends. Genet.*, **24**. P. 154–158.
- 116) Shahapure, R., Driessen, R. P., Haurat, M. F., Albers, S. V., Dame, R. T. (2014). The archaellum: a rotating type IV pilus. *Mol. Microbiol.*, **91**. P. 716-723.

- 117) Schlesner, M., Miller, A., Streif, S., Staudinger, W. F., Müller, J., Scheffer, B., Oesterhelt, D. (2009). Identification of Archaea-specific chemotaxis proteins which interact with the flagellar apparatus. *BMC microbiol.*, **9**, 56.
- 118) Silverman, M. and Simon, M. (1974). Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature*, **249**. P. 73–74.
- 119) Silverman, M., Zieg, J., Hilmen, M., Simon, M. (1979). Phase variation in *Salmonella*: genetic analysis of a recombinational switch. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**. P. 391–395.
- 120) Southam, G., Kalmokoff, M. L., Jarrell, K. F., Koval, S. F., Beveridge, T. J. (1990). Isolation, characterization, and cellular insertion of the flagella from two strains of the archaeobacterium *Methanospirillum hungatei*. *J. Bacteriol.*, **172**. P. 3221–3228.
- 121) Streif, S., Staudinger, W. F., Marwan, W., Oesterhelt, D. (2008). Flagellar rotation in the archaeon *Halobacterium salinarum* depends on ATP. *J. Mol. Biol.*, **384**. P. 1-8.
- 122) Strom, M. S. and Lory, S. (1993). Structure-function and biogenesis of the Type IV pili. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**. P. 565-596.
- 123) Sumper, M. (1987). Halobacterial glycoprotein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **906**. P. 69–79.
- 124) Sumper, M., Berg, E., Mengele, R., Strobel, I. (1990). Primary structure and glycosylation of the S-layer protein of *Haloferax volcanii*. *J. Bacteriol.*, **172**. P. 7111–7118.
- 125) Szabo, Z., Albers, S. V., Driessen, A. J. M. (2006). Active-site residues in the type IV prepilin peptidase homologue PibD from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.*, **188**. P. 1437–1443.

- 126) Szabo, Z., Sani, M., Groeneveld, M., Zolghadr, B., Schelert, J., Albers, S. V., Driessen, A. J. (2007). Flagellar motility and structure in the hyperthermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.*, **189**. P. 4305-4309.
- 127) Tarasov, V. Y., Kostyukova, A. S., Tiktopulo, E. I., Pyatibratov, M. G., Fedorov, O. V. (1995). Unfolding of tertiary structure of *Halobacterium halobium* flagellins does not result in flagella destruction. *J. Protein Chem.*, **14**. P. 27-31.
- 128) Tarasov, V. Y., Pyatibratov, M. G., Tang, S. L., Dyall-Smith, M., Fedorov, O. V. (2000). Role of flagellins from A and B loci in flagella formation of *Halobacterium salinarum*. *Mol. Microbiol.*, **35**. P. 69-78.
- 129) Thoma, C., Frank, M., Rachel, R., Schmid, S., Nather, D., Wanner, G., Wirth, R. (2008). The Mth60-fimbriae of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* are functional adhesins. *Environ. Microbiol.*, **10**. P. 2785–2795.
- 130) Thomas, N. A. and Jarrell, K. F. (2001). Characterization of flagellum gene families of methanogenic archaea and localization of novel flagellum accessory proteins. *J. Bacteriol.*, **183**. P. 7154–7164.
- 131) Thomas, N. A., Chao, E. D., Jarrell, K. F. (2001a). Identification of amino acids in the leader peptide of *Methanococcus voltae* preflagellin that are important in posttranslational processing. *Arch. Microbiol.*, **175**. P. 263–269.
- 132) Thomas, A. N., Bardy, B. L., Jarrell, K. F. (2001b). The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**. P. 147-174.
- 133) Trachtenberg, S., Galkin, V. E., Egelman, E. H. (2005). Refining the structure of the *Halobacterium salinarum* flagellar filament using the iterative helical real

- space reconstruction method: insights into polymorphism. *J. Mol. Biol.*, **346**. P. 665–676.
- 134) Tripathi, S. A. and Taylor, R. K. (2007). Membrane association and multimerization of TcpT, the cognate ATPase ortholog of the *Vibrio cholerae* toxin-coregulated-pilus biogenesis apparatus. *J. Bacteriol.*, **189**. P. 4401-4409.
- 135) Tripepi, M., Imam, S., Pohlschroder, M. (2010). *Haloflex volcanii* flagella are required for motility but are not involved in PibD-dependent surface adhesion. *J. Bacteriol.*, **192**. P. 3093–3102.
- 136) Tripepi, M., You, J., Temel, S., Onder, O., Brisson, D., Pohlschroder, M. (2012). N-glycosylation of *Haloflex volcanii* flagellins requires known Agl proteins and is essential for biosynthesis of stable flagella. *J. Bacteriol.*, **194**. P. 4876-4887.
- 137) Tu, D., Blaha, G., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2005). Gene replacement in *Haloarcula marismortui*: construction of a strain with two of its three chromosomal rRNA operons deleted. *Extremophiles*, **9**. P. 427-435.
- 138) Valliere-Douglass, J. F., Eakin, C. M., Wallace, A., Ketchum, R. R., Wang, W., Treuheit, M. J., Balland, A. (2010). Glutamine-linked and non-consensus asparagine-linked oligosaccharides present in human recombinant antibodies define novel protein glycosylation motifs. *J. Biol. Chem.*, **285**. P. 16012-16022.
- 139) Vandyke, D. J., Wu, J., Logan, S. M., Kelly, J. F., Mizuno, S., Aizawa, S. I., Jarrell, K. F. (2009). Identification of genes involved in the assembly and attachment of a novel flagellin N-linked tetrasaccharide important for motility in the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Mol. Microbiol.*, **72**. P. 633–644.
- 140) Voisin, S., Houliston, R. S., Kelly, J., Brisson, J. R., Watson, D., Bardy, S. L., Jarrell, K. F., Logan, S. M. (2005). Identification and characterization of the

- unique N-linked glycan common to the flagellins and S-layer glycoprotein of *Methanococcus voltae*. *J. Biol. Chem.*, **280**. P. 16586–16593.
- 141) Wieland, F., Paul, G., Sumper, M. (1985). Halobacterial flagellins are sulfated glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **260**. P. 15180-15185.
- 142) Williams, D, Gogarten, J. P., Papke, R. T. (2012). Quantifying homologous replacement of loci between haloarchaeal species. *Genome. Biol. Evol.*, **4**. P. 1223–1244.
- 143) Wirth, R. (2012). Response to Jarrell and Albers: seven letters less does not say more. *Trends microbiol.*, **20**. P. 511-512.
- 144) Woese, C. R., Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**. P. 5088-5090.
- 145) Xue, B., Dunbrack, R. L., Williams, R. W., Dunker, A. K., Uversky, V. N. (2010). PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1804**. P. 996-1010.
- 146) Yonekura, K., Maki, S., Morgan, D., DeRosier, D., Vonderviszt, F., Imada, K., Namba, K. (2000). The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science*, **290**. P. 2148–2152.
- 147) Yu, X., Goforth, C., Meyer, C., Rachel, R., Schroder, G. F., Egelman, E. H. (2012). Filaments from *Ignicoccus hospitalis* show diversity of packing in proteins containing N-terminal type IV pilin helices. *J. Mol. Biol.*, **422**, P. 274–281.

Хочу выразить свою искреннюю благодарность:

заведующему Группой надмолекулярных белковых структур Института белка РАН за предоставленную возможность выполнить данную работу и внимание к ней;

моему научному руководителю Пятибратову Михаилу Геннадиевичу за помощь в выполнении работы и научные консультации;

своим коллегам Безносову Сергею Николаевичу, Галевой Анне Владимировне и Петровой Любви Георгиевне за дружескую атмосферу и помощь в работе;

Сурина Алексею Константиновичу и Тиктопуло Елизавете Игнатъевне за помощь в выполнении некоторых экспериментов.

Так же хотел бы выразить благодарность заведующему Группой эволюционной геномики (Университет Мигеля Эрнандеса, Испания) профессору Родригез-Валере Франциско Эдуардо за предоставленную возможность стажироваться в его группе и Ане Белен Мартин-Куадрадо за помощь в работе, а также всему коллективу данной группы и в особенности Клаудии Мейе Эрнандес, Су-Дже Парку и Каролине Мегуми Мизуно.