Кострюкова Елена Сергеевна

Клонирование и экспрессия генов, кодирующих белки мембраны включения IncA-IncG *Chlamydia trachomatis*

03.00.04 – Биохимия 03.00.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

MOCKBA – 2007

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении Научноисследовательском институте физико-химической медицины Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию Российской Федерации

Научные руководители:	доктор биологических наук, профессор
	Говорун Вадим Маркович
	кандидат биологических наук, доцент
	Лазарев Василий Николаевич
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук, профессор
	Соколов Николай Николаевич
	доктор биологических наук
	Чернов Владислав Моисеевич
научный центр Российской Ака Защита диссертации состоится заседании Диссертационного С	«»2007 года вчасов на
•	й химии им. В.Н. Ореховича РАМН по адресу:
119121, Москва, ул. Погодинск	
С диссертацией можно ознаком	миться в библиотеке ГУ НИИ БМХ РАМН.
Автореферат разослан «»	2007 года
Ученый секретарь Диссертацио	онного Совета
кандидат химических наук	Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Chlamydia trachomatis облигатный внутриклеточный паразит, вызывающий у человека такие заболевания, как трахома, паховый лимфогранулематоз и урогенитальные хламидиозы, особенно репродуктивного здоровья женщин. Хламидии опасные ДЛЯ отлично адаптированы к условиям существования внутри эукариотической клетки благодаря уникальному двухфазному жизненному циклу, который представляет собой последовательную смену метаболических состояний микроорганизма инфекционного и вегетативного. Внутриклеточный этап развития хламидий происходит внутри мембранной вакуоли, называемой включением.

Располагаясь обособленного мембранного внутри компартмента, только формируют собственное комфортное не жизненное пространство, но и сохраняют способность активно влиять на клеточные инфицированной клетки, исключительно искусно подавляя и направляя их вплоть до завершения собственного цикла развития. Механизм подобного взаимодействия остается загадкой, поскольку мембрана включения непроницаема для молекул крупнее 520 Да, а в настоящее время известны только три белка хламидийной природы, секретируемые в цитоплазму инфицированной клетки. В составе мембраны включения не обнаружено эукариотических белков, характерных для эндосом и лизосом, при этом активно модифицируют поверхность включения с помощью продуктов собственного белкового синтеза, абсолютно необходимого для успешного развития инфекции. Предполагается, что именно белки мембраны включения являются медиаторами, опосредующими взаимодействия хламидий с эукариотической клеткой.

В первую очередь внимание исследователей привлекают представители семейства уникальных хламидийных белков, располагающихся в мембране включения, называемых Inc-белками (inclusion proteins). Inc-белки обнаружены у всех видов хламидий, причем их гомологи отсутствуют у каких-либо других известных организмов. Данные белки значительно отличаются между собой

последовательностями, Inc-белков аминокислотными однако ДЛЯ всех характерно наличие двудольного гидрофобного домена, состоящего из 50-80 аминокислот, который, возможно, и определяет их локализацию в мембране включения. Кроме того, в геномах хламидий обнаружено значительное число открытых рамок считывания, кодирующих белки со сходным гидрофобным профилем, причем подобные гены полностью отсутствуют во всех остальных известных сегодня геномах. Гидрофильные домены некоторых Іпс-белков располагаются на цитоплазматической поверхности мембраны включения и фосфорилируются киназами клетки-хозяина, а экспрессия большей части генов, кодирующих Іпс-белки, начинается в течение первых часов после заражения культуры клеток – все эти факты позволяют предположить, что данные белки могут играть ключевые роли в процессах развития хламидийной инфекции.

<u>**Цель работы.**</u> Цель работы - клонирование и экспрессия генов, кодирующих белки мембраны включения *C. trachomatis*

Задачи исследования.

- 1. Определение генетического полиморфизма генов, кодирующих белки мембраны включения IncA-IncG *C. trachomatis*.
- 2. Клонирование генов, кодирующих белки мембраны включения IncA-IncG *C. trachomatis*, в плазмидные векторы с репортерными генами для получения составных белков при экспрессии в линиях клеток млекопитающих.
- 3. Определение локализации белков мембраны включения IncA-IncG *C. trachomatis* при экспрессии кодирующих их генов в клетках линии HeLa.
- 4. Выявление ко-локализации белков мембраны включения IncA-IncG *C. trachomatis* с органеллами эукариотической клетки при экспрессии кодирующих их генов в клетках линии HeLa.
- 5. Клонирование генов, кодирующих белки мембраны включения IncB и IncC C. trachomatis в плазмидные векторы для последующей экспрессии в клетках E. coli.
- 6. Получение и очистка полноразмерных рекомбинантных белков IncB и IncC *C. trachomatis* и специфических антител к ним.

Научная новизна и практическая значимость работы. Несмотря на то, что первые белки семейства Іпс были открыты десять лет назад, функции их загадкой. остаются Ha сегодняшний обнаружены день некоторые биологические свойства только трех из них. Показано, что IncG C. trachomatis взаимодействовать с эукариотическим белком 14-3-3β, CT229 взаимодействует с Rab4A GTP-азой, IncA C. trachomatis принимает участие в включения, формировании единого ассоциирован включениями, и так же, как IncA C. psittaci, ингибирует развитие хламидийной инфекции при экспрессии кодирующего его гена в зараженной клетке. Кроме того, на основе данных о секреции IncA, IncB, IncC C pneumoniae, а так же IncC C. trachomatis в гетерологичных системах принято считать, что Іпс-белки являются эффекторами системы секреции III типа у хламидий. Функции остальных Іпс-белков до сих пор неизвестны. Их уникальность не позволяет делать предположения о возможной биологической роли на основании данных гомологах, а невозможность применения к хламидиям большинства классических методов молекулярной биологии заставляет исследователей искать обходные пути для выявления функций Іпс-белков. Одним из таких путей может стать изучение поведения Іпс-белков в гетерологичных системах. Полученные данные могут в дальнейшем найти применение при разработке альтернативных методов лечения хламидийной инфекции, в том числе с использованием генной терапии.

В настоящей работе реализован один из походов к выявлению функций белка и обнаружению его потенциальных белков-партнеров путем определения его локализации при гетерологичной экспрессии в эукариотической клетке. В результате впервые показана локализация шести Іпс-белков *С. trachomatis* при экспрессии кодирующих их генов в эукариотической клетке с образованием составных белков с GFP (green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок). С использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии впервые показана ко-локализация данных белков *С. trachomatis* с известными органеллами эукариотической клетки, относящимися к ее секреторному пути. Так же впервые получены рекомбинантные полноразмерные белки мембраны

включения *C. trachomatis* IncB и IncC, которые в дальнейшем могут быть использованы для выявления собственных белков-партнеров в реакциях белокбелкового взаимодействия. Кроме того, в результате определения генетического полиморфизма генов, кодирующих Inc-белки *C. trachomatis*, была показана высокая консервативность *incB* и *incC*, относящихся к числу генов ранней фазы, что может служить подтверждением значимости кодируемых ими белков для развития хламидийной инфекции.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на расширенном межлабораторном заседании Отдела молекулярной биологии и генетики ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава (Москва, 22 марта 2007 года), а так же в ходе конференций «Genomic Perspectives to Host Pathogen Interactions» (Hinxton, UK, 2006), «Международная школа-конференциия молодых ученых «Системная биология и биоинженерия» (Москва, 2005).

<u>Публикации.</u> Материалы диссертационной работы отражены в 4 публикациях (2 – в рецензируемых журналах, 2 – материалы конференций).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц и 29 рисунков. Состоит из следующих глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», который насчитывает 213 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии, бактериальные штаммы и плазмидные векторы. В работе были использованы клетки линии HeLa229 (ATCC, США) и бактериальные штаммы *E. coli* DH5α (Life Technologies, Великобритания), В834 (DE3) и ВL21 TrxВ (DE3) [pLysS] (Novagen, США). Референс штамм *C. trachomatis* D/UW-3/Cx (ATCC VR-885) был любезно предоставлен доктором Eva Hjelm, Уппсальский университет, Швеция. Клинические изоляты *С. trachomatis* были выделены из соскобов слизистой цервикального канала пациенток Института Акушерства и Гинекологии Д.О. Отта РАМН (Санкт-Питербург, Россия) в 1998-1999 гг. В процедурах клонирования и экспрессии использовались плазмидные векторы

pGEM-T/easy (Promega, США), pET-15b и pET-32a(+) (Novagen, США), pEGFP-N1 и pEGFP-C1 (Clontech, США).

Антитела и флуоресцентные красители. В работе использовались моноклональные антитела мыши к бычьему α-тубулину, моноклональные антитела мыши к Гольджин-97 человека, Alexa 594-конъюгированные антитела козы к иммуноглобулинам мыши, Alexa 594-конъюгированный фаллоидин, MitoTracker Red CMXRos, глибенкламид BODIPY TR (dipyrromethene boron difluoride, дипирометен бор дифлуорид) Alexa 594-конъюгированный WGA (wheat germ agglutinine, пшеничный зародышевый агглютинин) (Molecular Probes Inc, CIIIA).

Определение генетического полиморфизма генов *incA* - *incG*. Последовательности генов *incA* - *incG* амплифицировали методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров в программируемом термостате Thermal Cycler Abbott LCX Probe System (Великобритания) с помощью Pfu-полимеразы (МВІ Fermentas, Литва) согласно инструкции производителя. Нуклеотидные последовательности генов *incA* - *incG* определяли с использованием набора для термоциклического секвенирования Big DyeTM Terminator v.3.0 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, США). Реакцию проводили в объеме 20 мкл, содержавшем 10 нг плазмидной или геномной ДНК, 3,2 пМ специфического праймера и реакционную смесь (Terminator Ready Reaction Mix), предоставленную производителем. Продукты реакции анализировали с использованием автоматического секвенатора ABI Prism Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem, США, Hitachi, Япония).

Клонирование полноразмерных генов *incA* - *incG*. Полноразмерные гены *incA* - *incG* амплифицировали с использованием специфических праймеров, в состав которых вводили сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции (HindIII, EcoRI, BamHI, NcoI, NdeI либо XhoI (MBI Fermentas, Литва)), как указано выше. Продукты амплификации очищали с помощью набора Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, CША) и клонировали в плазмиду рGEM-T/easy (Promega, CША) согласно инструкции производителя. Далее гены Inc-белков субклонировали в плазмидные векторы pEGFP-N1, pEGFP-C1, pET-15b и pET-32a согласно стандартным протоколам с использованием соответствующих эндонуклеаз рестрикции и Т4 ДНК-лигазы (МВІ Fermentas, Литва).

Экспрессия генов *incB* и *incC* в клетках *E.coli*. Культуру клеток *E.coli* B834 (DE3) либо BL21 (DE3) [pLysS] Trx В трансформировали плазмидными конструкциями pET-15b/IncB и pET-15b/IncC, либо pET-32a/IncB и pET-32a/IncC. Несколькими рекомбинантными колониями инокулировали 100 мл среды ТВ (1,2% бактотриптон, 2,4% дрожжевой экстракт, 4% глицерин, 17 мМ KH₂PO₄, 72 мМ К₂HPO₄), содержащей ампициллин (50 мкг/мл) для штаммов ампициллин (50 мкг/мл), хлорамфеникол (34 мкг/мл) и канамицин (15 мкг/мл) для штаммов

В834 [pLysS] и BL21 TrxB (DE3) [pLysS], соответственно, и растили при температуре 37°C и постоянном встряхивании до достижения культурой оптической плотности OD₆₀₀=1,2. Экспрессию гена целевого белка индуцировали добавлением изопропил-β-D-тиогалактозида до конечной концентрации 0,1 мМ. Культуры инкубировали от 2,5 до 17 часов при 30°C и постоянном встряхивании, центрифугировали при 6000g 30 мин, осадки замораживали при -75°C. Наличие целевого белка подтверждали с помощью денатурирующего электрофореза в 12-15% полиакриламидном геле согласно стандартной методике.

Выделение рекомбинантных белков из клеток *E.coli*. Осадки культур *E.coli* размораживали при 0°С и суспендировали в 10 мл буфера (20мМ Na₃PO₄, 20% глицерина 0,5М NaCl, 10мМ имидазола). Смесь подвергали ультразвуковой дезинтеграции (22 кГц 15х10 с.) до образования гомогенной суспензии. Далее добавляли 0,5% Emulgen 913, инкубировали 30 минут во льду при перемешивании и центрифугировали при 45000g 1,5 часа. Наличие рекомбинантного белка в осадке и надосадочной жидкости определяли с помощью денатурирующего электрофореза в 12-15% полиакриламидном геле.

Для выделения рекомбинантного белка из растворимой фракции клеточного лизата осадки культур $E.\ coli$ суспендировали в 10мл буфера (20мМ Na₃PO₄, 20% глицерина, 0,5М NaCl, 10мМ имидазола), для выделения рекомбинантного белка из нерастворимой фракции клеточного лизата - в 10мл буфера (20мМ Na₃PO₄, 20% глицерина, 0,5М NaCl, 10мМ имидазола, 8М мочевина), суспензии центрифугировали при 45000g 1,5 часа. Полученный супернатант фильтровали через нейлоновый фильтр (диаметр пор 0,45 мкм) и подвергали металло-хелатной аффинной хроматографии на хроматографической системе АКТА FPLC (Amersham Biosciences, США), используя колонку Tricorn 10/50 (Amersham Biosciences, США). В качестве стартового буфера использовали буферные растворы того же состава, что и для фракционирования, элюцию проводили ступенчатым градиентом концентрации имидазола (20мМ, 100мМ, 200мМ, 300мМ) в буфере аналогичного состава. В ходе хроматографии собирали фракции элюата, имевшие $A_{280} > 0,05$. Собранные фракции анализировали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле.

Разделение составных белков TrxA-IncB и TrxA-IncC. Гидролиз составных белков проводили при +4°C в течение 22 часов. Реакционная смесь содержала 20 мМ натрийфосфатного буфера, 0,5 М NaCl, 20% глицерина, 1мМ CaCl₂, 2 мг составного белка и 2 единицы рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека (Invitrogen, США). Полученные белки разделяли с использованием набора HisTrapTM Kit (Amersham Biosciences AB, Швеция) согласно инструкции производителя.

Иммунизация лабораторных животных. Иммунизация кроликов препаратами белков IncB и IncC и отбор крови осуществлялись в лаборатории цитологии опухолевого роста Института

цитологии РАН под руководством д.б.н. В. А. Иванова. 30-50 мкг рекомбинантного белка в объеме 100 мкл фосфатного буфера (1,7мМ NaCl, 17мМ NaH2PO4, 170мМ Na2HPO4) инъецировали кроликам троекратно с интервалом в 3 недели, после чего через 14 дней отбирали 50 мл крови.

Выделение и очистка поликлональных антител к рекомбинантным белкам IncB и IncC. К 5 мл сыворотки крови кролика добавляли сухой сульфат аммония до концентрации ~40% от насыщения, тщательно перемешивали и выдержали на льду 30 минут. Образовавшуюся суспензию центрифугировали при 5000g 20 минут, осадок иммуноглобулинов промывали 40% от насыщения раствором сульфата аммония и повторно центрифугировали при 5000g 20 минут. Осадок растворяли в 5 мл 25мМ натрий-фосфатного буфера (рН 7,5). Полученную фракцию иммуноглобулинов хроматографировали на DEAE-Sepharose FF на колонке Tricorn 10/50 на хроматографической системе АКТА FPLC (Amersham Biosciences, США), после чего истощали против лизата клеток *E. coli*.

Трансфекция клеток линии HeLa. Клетки HeLa культивировались в среде ДМЕМ (Sigma, США) с 10% сыворотки эмбрионов коров (HyClone, США), 10 мкг/мл гентамицина при 37°C в атмосфере 5% CO₂ на стерильных стеклах в течение 24 часов до достижения 50-70% монослоя. Трансфекцию клеток линии HeLa плазмидной ДНК проводили с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Анализ экспрессии генов осуществляли через 20 часов после трансфекции. Преператы промывали фосфатным буфером (1,7 мМ NaCl, 17mM NaH₂PO₄, 170mM Na₂HPO₄), фиксировали 2% параформальдегидом 30 минут, затем повторно промывали фосфатным буфером. Жизнеспособность клеток линии HeLa, экспрессирующих гены Inc-белков *C. trachomatis*, оценивали с помощью набора LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (for animal cells) (Molecular Probes Inc, США) согласно инструкции производителя.

Конфокальная микроскопия. Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию и иммунофлоресцентный анализ осуществляли с использованием конфокального флуоресцентного микроскопа Eclipse E800 (Nikon, Япония) с VEM Epi-Fluorescence насадкой, укомплектованного аргоновым (используемая длина волны 488 нм) и гелийнеоновым (используемая длина волны 594 нм) лазерами (Nicon Corporation, Япония), под объективом 60х, ЧА 1,4 с масляной иммерсией. Конфокальные изображения с шагом по Z оси получали с интервалом в 0,25 мкм и записывали с помощью программы EZ-C1 2.00 Software (Nikon, Япония). Изображения обрабатывали с помощью программ Image Pro-plus 5.1 (Media Cybernetics, США) и Adobe Photoshop v. 6.0 software (Adobe Systems).

Флуоресцентное окрашивание органелл эукариотических клеток. Окрашивание митохондрий, эндоплазматического ретикулума и плазматической мембраны проводили в препарате живых клеток с использованием проникающих флуоресцентных красителей через

12, 18, 20, 24 и 36 часов после трансфекции. Окрашивание митохондрий осуществляли с помощью 500 нМ MitoTracker в D-MEM в течение 15 минут и отмывали препарат перед монтированием. Окрашивание эндоплазматического ретикулума осуществляли использованием 2 мкМ ER-Tracker в HBSS течение 15 минут и отмывали препарат перед монтированием. Окрашивание плазматической мембраны осуществляли с помощью 5 мкг/мл Alexa Fluor 594 WGA в HBSS в течение 15 минут и отмывали препарат перед монтированием. Для окрашивания F-актина, α-тубулина и аппарата Гольджи клетки фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 5 минут при комнатной температуре и пермеабилизировали в 0,5% Triton-X-100 в течение 10 минут при комнатной температуре. Образцы блокировали с использованием 2% козьей сыворотки либо 2% бычьего сывороточного альбумина в TNT-буфере (0,1 M Tris-HCl [pH 7,5], 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20) от 30 до 40 минут. Затем образцы инкубировались с соответствующими антителами либо с фаллоидином в течение ночи при 4°C, отмывались и инкубировались с Alexa 594конъюгированными антителами в течение ночи при 4°C (за исключением фаллоидина), затем отмывались и просушивались перед монтированием.

Для визуализации *C. trachomatis* в клетках линии HeLa использовали набор «ХлаМоноСкрин» («Ниармедик Плюс», Россия) согласно инструкции производителя, а так же поликлональные кроличьи антитела к белкам IncB и IncC *C. trachomatis*, с использованием вторичных флюоресцеинизотиоцианат-меченных антител осла к иммуноглобулинам кролика.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение генетического полиморфизма генов, кодирующих Inc-белки *C. trachomatis*.

С целью определения генетического полиморфизма генов, кодирующих Іпсбелки *С. trachomatis*, были определены нуклеотидные последовательности генов *incA*, *incB*, *incC*, *incD*, *incE*, *incF* и *incG* восьми клинических изолятов *С. trachomatis*. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями генов, кодирующих аналогичные Іпс-белки лабораторного штамма *С. trachomatis* D/UW-3/Cx и аннотированными в Gene Bank (AE001296). Нами были выявлены ряд нуклеотидных замен, в том числе приводящих к аминокислотным (таб. 1), наличие которых не удалось связать ни с сероваром исследуемых клинических изолятов, ни с их устойчивостью к

Таблица 1. Нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные замены, обнаруженные в последовательностях генов, кодирующих Іпс-белки, по сравнению с последовательностями штамма *C. trachomatis* D/UW-S/Cx, представленными в Gene Bank. Нуклеотидные последовательности *incG* изолята 1309 и *incD* изолятов 1553 и 4873 не определялись.

Ген	Нуклеотидная замена	Клинический изолят
inc A	665G→A (Ser→Lys); 231A→G	190, 5736
incC	366A→G; 390C→T; 477T→C	553
incD	78T→C; 80T→C (Leu→Pro 26); 113C→T (Ala→Val 37); 142A→G (Ile→Val 47); 205G→T (Val→Leu68); 406 вставка A (Thr→Ile)	190, 309, 378, 2103, 2293, 5736
	303G→A	2103, 2293
incE	37C→T (Arg→Cys12); 47A→G (Asn→Ser15); 337G→A (Ala→Thr112)	190, 378, 1309, 2103, 2293, 4873, 5736
	56A→G (Asp→Gly18); 79A→C (Lys→Gln 26); 110,111CA→TG (Ala→Val 36); 113C→T (Ala→Val 37); 116G→C (Cys→Ser 38); 190G→A (Gly→Ser 63); 202C→A (Leu→Ile 67); 214A→G	190, 378, 1309, 1553, 2103, 2293, 4873, 5736
	(Ile \rightarrow Val 71); 251C \rightarrow T (Thr \rightarrow Ile 83); 274A \rightarrow G (Asn \rightarrow Asp 91)	
	376 делеция С	378, 1309, 4873
	44A→C (Asn→Ala 14); 243G→A; 278A→G (His→Arg 92)	1553
incF	59A→G	190, 378, 1309, 2103, 2293, 4873, 5736
	65G→T (Lys→Asn 21)	190, 378, 1553, 2103, 2293, 4873, 5736
	51T \rightarrow C (Trp \rightarrow Gly17); 82T \rightarrow C (Met \rightarrow Thr 27); 251T \rightarrow C; 257A \rightarrow G	190, 378, 1309, 1553, 2293, 2103, 4873, 5736
	61G→A; 90G→A (Arg→His 30)	1553
incG	9T→C; 230G→T (Cys→Phe76); 236A→G (Tyr→Cys78); 260G→A (Ser→Asn 86); 405G→T (Leu→Phe135); 406C→G (Arg→Gly135); 423T→G (Phe→Val141)	190, 378, 1553, 2103, 2293, 4873, 5736
	$98T \rightarrow C \text{ (Val} \rightarrow \text{Ala 32); } 406C \rightarrow G \text{ (Arg} \rightarrow \text{Gly135)}$	190, 378, 1553, 2103, 2293, 4873

антибиотикам. Согласно полученным нами данным, наиболее вариабельными являются гены, принадлежащие DEFG-оперону C. trachomatis - для них было обнаружено наибольшее число нуклеотидных замен, в том числе приводящих к аминокислотным. Для incA были обнаружены две нуклеотидные замены, ранее описанные в литературе. Наиболее консервативными оказались incB и incC — для incB не было показано ни одной нуклеотидной замены среди восьми клинических изолятов, для incC только у одного из них были обнаружены три

незначащие нуклеотидные Проведенное сравнение замены. нами последовательностей IncB и IncC штаммов AR39, CWL029, J138 и TW-183 C. pneumoniae, опубликованных в GeneBank (AAF38304, AAD18440, BAA9850, AAP98233, NP 876577, BAA502, H7 2095), также показало консервативность белков внутри данного Полученные ЭТИХ вида. результаты свидетельствовать о высокой значимости IncB и IncC для физиологии хламидий, поскольку консервативность характерна прежде всего для белков, принимающих участие в реализации ключевых клеточных процессов.

Клонирование полноразмерных генов, кодирующих Inc-белки C. trachomatis, в экспрессирующие плазмидные векторы.

Полноразмерные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих белки IncA, IncB, IncC, IncD, IncE, IncF и IncG C. trachomatis, амплифицировали с использованием специфических праймеров, в последовательности которых были введены сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции. Продукты амплификации клонировали в плазмиду pGEM-T/easy, отбор рекомбинантных бело-голубой клонов осуществляли методом селекции. Соответствие клонированных последовательностей целевым подтверждали с помощью определения их нуклеотидной последовательности. Далее гены Inc-белков субклонировали в плазмидные векторы pEGFP-N1, pEGFP-C1, pET-15b и pET-32а согласно стандартным протоколам с использованием соответствующих эндонуклеаз рестрикции. Рекомбинантные клоны отбирали в результате контрселекции на твердом LB-агаре с соответствующими антибиотиками (30 мкг/мл канамицина для pEGFP-N1и pEGFP-C1 либо 50 мкг/мл ампициллина для pET-15b и pET-32a), сохранность рамки считывания так же подтверждали путем определения нуклеотидной последовательности.

Определение локализации Inc-белков *C. trachomatis* при экспрессии их генов в клетках линии HeLa.

Для определения локализации Inc-белков при экспрессии кодирующих их генов в эукариотических клетках мы воспользовались репортерной системой на

основе GFP — белка, способного к видимой флуоресценции ($\lambda_{\text{исп}}$ 508 нм) в ультрафиолетовых лучах ($\lambda_{\text{погл}}$ 395-498 нм). GFP широко используется в молекулярной биологии для получения составных белков, поскольку в большинстве случаев не оказывает существенного влияния на конформацию исследуемого белка и его функцию. Обычно при выборе расположения GFP учитывают возможное влияние репортера на сигнальные последовательности и активные центры изучаемого белка. Поскольку у Іпс-белков отсутствуют явные сигнальные последовательности, мы определяли локализацию обоих возможных составных белков для каждого из исследуемых Іпс-белков.

Полноразмерные гены *incA*, *incB*, *incC*, *incD*, *incE*, *incF* и *incG C*. *trachomatis* клонировали в плазмидные векторы pEGFP-N1 и pEGFP-C1, полученные конструкции были названы pN1-IncX и pC1-IncX (puc.1 a, б), а образующиеся составные белки - IncX-GFP и GFP-IncX, соответственно. Данными конструкциями трансфицировали эукариотические клетки линии HeLa путем липофекции, локализацию образующихся составных белков определяли с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. В качестве контроля использовали исходные векторы pEGFP-N1 и pEGFP-C1.

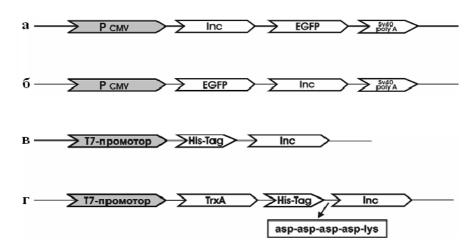


Рисунок 1. Схема рекомбинантных конструкций для экспрессии генов, кодирующих Inсбелки *C. trachomatis*, на основе плазмидных векторов PEGFP-N1 (a), pEGFP-C1 (б), pET-15b (в) и pET-32a(+) (г). Стрелкой указан сайт гидролиза энтерокиназой человека.

По результатам конфокальной микроскопии нами было показано, что для трех из семи выбранных нами белков – IncA, IncB и IncF – локализация

составных белков практически совпадала для парных конструкций, то есть не зависела от расположения молекулы GFP. При этом составные белки формировали густую сеть, заполняющую внутреннее пространство клетки за исключением ядра и плазматической мембраны (рис. 2, а, б, е). Помимо этого, рекомбинантные белки IncA-GFP и GFP-IncA формировали гранулы, которые с течением времени увеличивались в размерах (рис. 2, а).

Для IncC, IncD, IncE и IncG была показана различная локализация составных белков, в зависимости от расположения молекулы GFP. Составные белки IncC-GFP, IncD-GFP, IncE-GFP и IncG-GFP гомогенно распределялись по

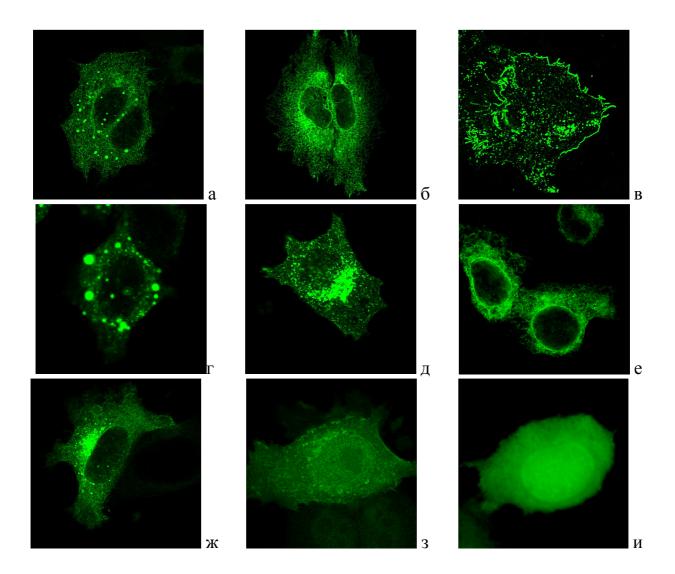


Рисунок 2. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия клеток HeLa, трансфицированных экспрессирующими векторами через 20 часов после трансфекции. Показана локализация белков: а – GFP-IncA, б - GFP-IncB, в – GFP-IncC, г - GFP-IncD, д – GFP-IncE, е - GFP-IncF, ж – GFP-IncG, з - IncG-GFP, и – GFP (вектор pEGFP-C1).

всей клетке, включая ядро (рис. 2, 3), подобно свободному GFP (рис. 2, и), что может быть вызвано экранированием молекулой GFP гидрофобных доменов и/или сигнальных последовательностей, определяющих специфическую локализацию этих белков. Однако в отличие от свободного GFP, данные составные белки так же демонстрировали связь с мембранными органеллами клетки, которая может объясняться выраженной гидрофобностью Inc-белков и являться неспецифичной.

Парные им составные белки демонстрировали иную локализацию. Распределение в клетке составного белка GFP-IncD (рис. 2, г) было очень похоже на морфологические картины, наблюдаемые для IncA-GFP и GFP-IncA. Составные белки GFP-IncE и GFP-IncG формировали крупные скопления в полярной околоядерной области клетки, что может свидетельствовать о их взаимодействиях с аппаратом Гольджи (рис. 2, д, ж). Составной белок GFP-IncC практически полностью локализовался в области плазматической мембраны клетки, четко очерчивая ее поверхностные образования (рис. 2, в).

Таким образом, полученные нами данные о локализации составных белков показали их предположительную взаимосвязь с мембранными органеллами клетки, входящими в состав секреторного пути, через который проходит адресная доставка белков в эукариотической клетке.

Выявление ко-локализации Inc-белков *C. trachomatis* с эукариотическими органеллами при экспрессии кодирующих их генов в клетках линии HeLa.

Согласно полученным нами данным специфическую локализацию в клетке прежде всего демонстрировали белки, полученные на основе вектора рЕGFP-С1, поэтому для уточнения локализации составных Іпс-белков и наблюдения за динамикой их накопления в эукариотической клетке мы использовали экспрессирующие конструкции на основе данного вектора. Клетки линии HeLa трансфицировали экспрессирующими конструкциями рС1-IncX, полученные препараты окрашивали с использованием флуоресцентных красителей и антител, специфически связывающихся с белками цитоскелета, митохондриями, аппаратом Гольджи, ЭПР и плазматической мембраной

эукариотической клетки. Ко-локализацию составных белков и флуоресцентно окрашенных клеточных структур осуществляли с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Ни для одного из семи Іпс-белков, исследуемых в данной работе, не удалось выявить ко-локализацию с митохондриями, актиновым цитоскелетом и тубулиновыми микрофиламентами, что служит подтверждением специфичности полученных нами результатов.

Поскольку у эукариот синтез белка связан с шероховатым ЭПР, мы прежде всего проверили возможность ко-локализации изучаемых составных белков с данной органеллой. И, действительно, все семь составных Іпс-белков ко-локализовались с ЭПР через 12 часов после трансфекции, хотя дальнейшая судьба этих белков различалась.

Составные белки GFP-IncB и GFP-IncF на протяжении всего цикла наблюдения выявлялись только в составе ЭПР (рис. 3 – а, б, в). Подобная локализация может быть объяснена либо нарушением свертывания данных белков при их синтезе в эукариотической клетке, либо, наоборот, их специфической тропностью к эндоплазматическому ретикулуму.

Составной белок GFP-IncA с течением времени так же накапливался в четко очерченной сети ЭПР. Остальная масса белка располагалась в гранулах, которые ориентированы вдоль тубулиновых микротрубочек и равномерно распределялась по всей клетке между актиновым цитоскелетом (рис. 3 – г, д, е). Отсутствие ко-локализации гранул, формируемых GFP-IncA, с ЭПР может служить подтверждением гипотезы о их формировании в условиях избыточной продукции данного составного белка за счет склонности IncA к димеризации и олигомеризации.

Составной белок GFP-IncD, подобно GFP-IncA, начиная с 12 часов и до поздних сроков трансфекции оставался связан с ЭПР. Вероятно, синтез GFP-IncD сопровождался его транспортом до зон выхода из ЭПР, и заканчивался в ЭПР-Гольджи промежуточном компартменте. Формируемые данным белком крупные гранулы неравномерно распределялись в клетке и ко-локализовались с ЭПР, что отличает их от аналогичных гранул GFP-IncA (рис. 3 – ж, з, и).

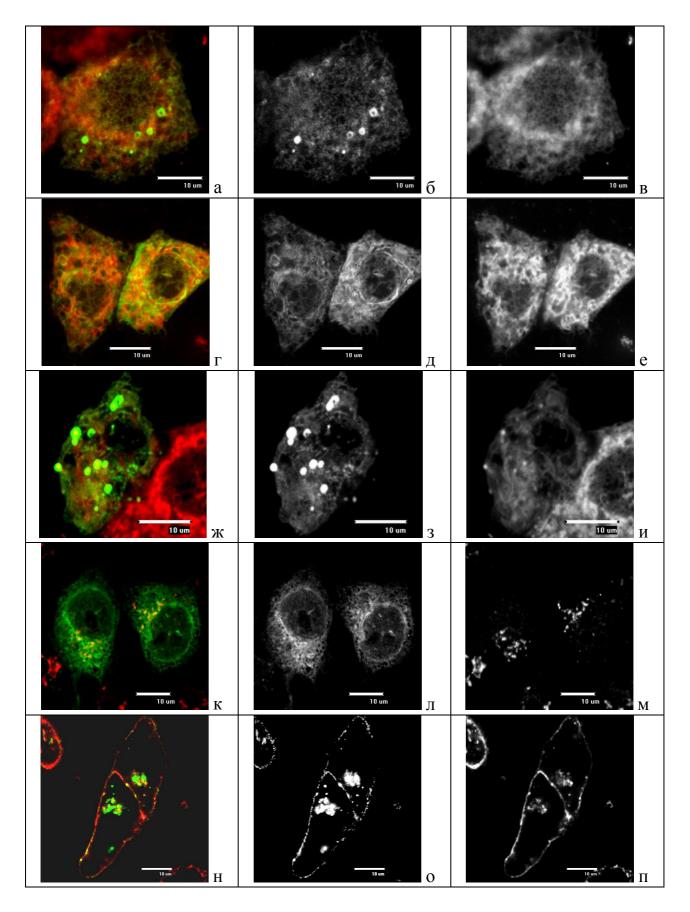


Рисунок 3. Локализация составных белков GFP-IncA (а, б, в) и GFP-IncB (г, д, е), GFP-IncD (ж, з, и), GFP-IncG (к, л, м) и GFP-IncC (н, о, п). Клетки окрашены на ЭПР (а, б, в, г, д, е, ж, з, и), аппарат Гольджи (к, л, м) и плазматическую мембрану (н, о, п); а, г, ж, к, н – наложение каналов; б, д, з, л, о – зеленый канал; в, е, и, м, п – красный канал.

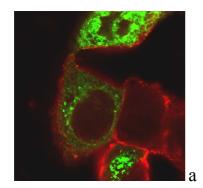
Составные белки GFP-IncE и GFP-IncG через 12 часов после трансфекции ЭПР, 16 ко-локализовались c маркером но К часам наблюдалось перераспределение белков в результате компактного скопления в области аппарата Гольджи, что было подтверждено окраской соответствующими антителами (рис. 3 – к, л, м). На поздних стадиях трансфекции составные белки GFP-IncE и GFP-IncG практически не обнаруживались в ЭПР, ко-локализуясь с цистернами аппарата Гольджи и отходящими от них пузырьками, что было показано с помощью красителя WGA-Alexa 594.

Составной белок GFP-IncC к 12 часам от начала трансфекции колокализовался с ЭПР, но к этому времени так же выявлялся в везикулах, аппарате Гольджи и тубуло-везикулярных образованиях, направленных к периферии клетки. К 15 часам от начала трансфекции флюоресценция GFP-ІпсС регистрировалась большей частью на периферии клетки, ко-локализуясь с WGA, связанным с Alexa Fluor 594 – маркером пост-Гольджи сети. К 19 часам практически весь белок GFP-IncC распределялся в области плазматической мембраны клетки (рис. 3 – н. о. п.). Возможно, подобное распределение в клетке определяется вторичной структурой IncC - в отличие от остальных белков, изучаемых в нашей работе, его гидрофобный домен располагается в карбокситерминальной части молекулы, остающейся свободной именно в составном белке GFP-IncC. Не исключено так же, что в области этого домена располагается специфическая сигнальная последовательность, обеспечивающая тропность IncC к плазматической мембране, а возможно и встраивание данного белка В ee состав; однако эта гипотеза требует дополнительного подтверждения.

С целью уточнения механизма доставки составного белка GFP-IncC в область плазматической мембраны клетки линии HeLa трансфицировали рекомбинантным плазмидным вектором pC1-IncC, инкубировали 4 часа, после чего добавляли таксол — препарат, блокирующий деполимеризацию микротрубочек. Локализацию составного белка GFP-IncC определяли с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии через 15, 16, 17, 18, 19 и 22 часа после трансфекции, клетки окрашивали на наружную мембрану

и пост-Гольджи. По результатам конфокальной микроскопии, начиная с 15 часов после трансфекции в культуре клеток, обработанных таксолом, составной белок GFP-IncC обнаруживался в области эндоплазматического ретикулума, а так же формировал нерегулярные полиморфные структуры, напоминающие ЭПР – Гольджи промежуточный компартмент (ERGIC) (рис. 4, a). Данная морфологическая картина наблюдалась на протяжении нескольких часов, и только к 19 часам после трансфекции данный белок обнаруживался в области плазматической мембраны клетки, причем большая его часть оставалась связана с ЭПР и ERGIC-подобными структурами. Полученный результат существенно отличался от морфологической картины, наблюдаемой в те же сроки в культуре трансфицированных клеток, не обработанных таксолом, когда к 15 часам после трансфекции основная масса белка обнаруживается на периферии клетки (рис. 4, б). Таким образом, присутствие таксола в ростовой среде приводит к нарушению распределения составного белка GFP-IncC в необходимости клетке, что свидетельствует нормального динамической реорганизации сети микротрубочек для обеспечения доставки данного белка к плазматической мембране эукариотической клетки.

Таким образом, обнаруженная в результате нашего исследования взаимосвязь Іпс-белков *С. trachomatis* с ЭПР, аппаратом Гольджи и плазматической мембраной позволяет предположить, что по крайней мере



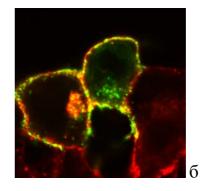


Рисунок 4. Влияние таксола на локализацию составного белка GFP-IncC.

Клетки линии Hela, трансфицированные вектором pC1-IncC и окрашены на наружную мембрану и пост-Гольджи через 15 часов после трансфекции; а – с добавлением таксола через 4 часа после трансфекции, б – без добавления таксола.

некоторые из них могут включаться в секреторный путь эукариотической клетки. Одним из аргументов в пользу данной гипотезы может служить изменение распределения составного белка GFP-IncC в клетках, обработанных таксолом, поскольку транспорт белков из ЭПР к аппарату Гольджи и затем через транс-Гольджи сеть в составе секреторного пути происходит с участием микротрубочек. Данное наблюдение особенно интересно, секреторный путь часто вовлекается в реализацию воздействия патогенных микроорганизмов на эукариотическую клетку - с его помощью бактерии осуществляют доставку собственных секретируемых токсинов к их клеточным мишеням, а Іпс-белки относят к числу возможных эффекторов системы секреции III типа у хламидий. Кроме того, обнаружение GFP-IncC в составе везикул, циркулирующих от аппарата Гольджи до наружной мембраны, а IncG и IncE в составе везикул транс-Гольджи сети позволяет предположить участие этих белков в распознавании и перехвате экзоцитарных пузырьков, которые транспортируются из аппарата Гольджи к наружной мембране, в результате чего хламидии получают различные липиды, необходимые им для построения мембраны включения и обеспечения собственного размножения.

В нашей работе мы не только достигли эффективной экспрессии генов, кодирующих семь Inc-белков *C. trachomatis*, в эукариотической клетке, но и показали их ко-локализацию с известными клеточными структурами. Чтобы подтвердить достоверность полученных нами результатов, мы решили определить локализацию полноразмерных Inc-белков при экспрессии их генов в эукариотической клетке без введения в состав белка дополнительных репортерных последовательностей, но с использованием классических методов иммуногистохимии. Поскольку в нашей работе по изучению составных белков с GFP для четырех из них локализация в клетке зависела от расположения молекулы репортера, а для трех — нет, мы решили включить в дальнейшее исследование по одному из белков из каждой группы. Нами были выбраны IncB и IncC, как наиболее консервативные не только у *C. trachomatis*, но и у *Chlamydiaceae*. Гены, кодирующие данные белки, относятся к числу экспрессируемых хламидиями на самых ранних этапах внутриклеточного

развития, что может свидетельствовать о значимости роли этих белков в процессе развития хламидийной инфекции.

Получение и очистка полноразмерных рекомбинантных белков IncB и IncC *C. trachomatis* и специфических антител к ним.

Первоначально для получения конструкций, экспрессирующих гены белков мембраны включения IncB и IncC C. trachomatis в E. coli, мы клонировали полноразмерные гены *incB* и *incC* в плазмидный вектор pET-15b для получения составных белков с последовательностью из шести остатков гистидинов, позволяющей осуществлять быструю и эффективную очистку рекомбинантного белка металлохелатной аффинной хроматографией. Полученные конструкции, названные pET-15b/IncB и pET-15b/IncC (рис. 1, в), и исходный вектор были использованы для трансформации E. coli штамма B834 (DE3). Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле показал в лизатах клеток, несущих рекомбинантную плазмиду, наличие белковых фракций с молекулярными массами, соответствующими предсказанным для рекомбинантных His-IncB и His-IncC (15,1 и 22,1 кДа соответственно). В клеток, трансформированных конструкцией pET-15b/IncC, они лизатах после добавления изопропил-β-D-тиогалактозида, достигали появлялись наибольшей концентрации ко второму часу после индукции экспрессии и практически полностью исчезали через 18 часов, что соответствовало литературным данным о нерастворимости Іпс-белков и токсичности для клеток при экспрессии их полноразмерных генов в гетерологичных системах. В лизатах клеток, трансформированных конструкцией рЕТ-15b/IncB, содержание His-IncB достигало максимума через 18 часов после индукции. Выделение и очистку рекомбинантных белков His-IncB и His-IncC из клеток E. coli металлохелатной аффинной осуществляли методом хроматографии, предварительно определив растворимость рекомбинантных белков в буфере для нанесения образца, рекомендованном производителем. По результатам фракционирования рекомбинантные белки выделяли из 2,5-часовой культуры E. coli, содержавшей His-IncC, и 18-часовой культуры E. coli, содержавшей HisIncB, в буфере с 8М мочевиной. Однако нам не удалось добиться чистоты образцов, необходимой для дальнейшего использования. Наличие в элюате значительного количества белковых примесей не менялось при ужесточении условий очистки, что может объясняться высокой способностью белков IncB и IncC к образованию надмолекулярных белковых комплексов.

Поскольку попытки оптимизировать условия выделения His-IncB и His-IncC не привели к повышению чистоты получаемого образца, нами были получены аналогичные рекомбинантные конструкции на основе плазмиды рЕТ-32а, позволяющие получить составные белки с тиоредоксином А (TrxA). Наличие TrxA в составе химерного белка значительно увеличивает его растворимость в цитоплазме *E. coli*, особенно при использовании штаммов, дефектных по TrxB (тиоредоксин редуктаза В). Данные плазмидные векторы, получившие названия рЕТ-32а/IncB и рЕТ-32a/IncC (рис. 1, г), и исходный вектор были использованы для трансформации *E. coli* штамма BL21 TrxB (DE3) [рLysS]. Максимальное содержание рекомбинантных Inc-белков наблюдалось в лизатах 18-часовой культуры клеток *E. coli*. Соответствие данных фракций на полиакриламидном геле целевым составным белкам было подтверждено с помощью масс-спектрометрического анализа.

Выделение и очистку рекомбинантных белков TrxA-IncB и TrxA-IncC из клеток $E.\ coli$ осуществляли аналогичным методом из 2,5-часовых культур E.coli в буфере без 8M мочевины. В результате очистки нами были получены электрофоретически чистые составные белки TrxA-IncB и TrxA-IncC. При этом выход рекомбинантных белков из 2,5-часовых культур клеток *E. coli* составил 6 мг/л для TrxA-IncB и 3 мг/л для TrxA-IncC. Очищенные составные белки TrxA-IncB и TrxA-IncC были подвергнуты гидролизу рекомбинантной легкой цепью энтерокиназы человека (рис. 1, г), в результате чего были получены смеси Іпсбелка (IncB – 12,88 кДа, IncC – 19,87 кДа) и тиоредоксина А (17,43 кДа), связанного cпоследовательностью ИЗ шести гистидинов Окончательную очистку рекомбинантных Іпс-белков осуществляли методом металлохелатной аффинной хроматографии.

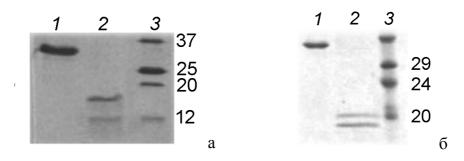


Рисунок 5. Электрофоретический анализ продуктов гидролиза составных белков TrxA-IncB (а) и TrxA-IncC (б) рекомбинантной легкой цепью энтерокиназы человека. 1 – составной белок, 2 – продукты гидролиза, 3 – маркер молекулярной массы, кДа.

С целью получения поликлональных антител к рекомбинантным белкам IncB и IncC *C. trachomatis* мы иммунизировали кроликов препаратами данных рекомбинантных белков троекратно с интервалом в 3 недели. После чего из сыворотки крови кроликов была выделена общая фракция иммуноглобулинов, которая в дальнейшем истощалась против лизата клеток *E. coli* штамма BL21 TrxB (DE3) [pLysS], который использовался для получения исходных составных белков TrxA-IncB и TrxA-IncC. Полученные поликлональные антитела тестировали иммуноблоттингом против исходных антигенов и в 24 часовой культуре клеток HeLa, зараженных *C. trachomatis* (рис. 6).

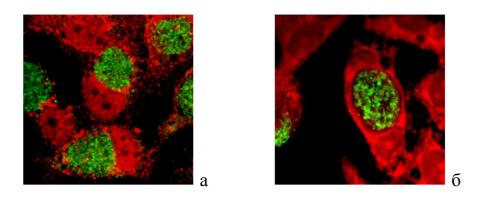


Рисунок 6. Окрашивание включений *C. trachomatis* специфическими антителами.

Препараты 24 часовой культуры клеток HeLa, зараженных *C. trachomatis*; а - окраска Эванс Блю (красный) и моноклональными антителами к липополисахариду хламидий (зеленый), набор «ХлаМоноСкрин» («Ниармедик Плюс», Россия), б – окраска WGA (красный) и поликлональными антителами кролика к IncC *C. trachomatis* (зеленый).

Таким образом, нами впервые получены полноразмерные белки мембраны включения *C. trachomatis* IncB и IncC, которые будут использованы

для выявления белков-партнеров в реакциях белок-белкового взаимодействия, а так же антитела к ним, что предоставляет в наше распоряжение дополнительный эффективный инструмент для дальнейших исследований. Мы предполагаем, что обнаружение белков-партнеров может внести существенные изменения в понимание ранних процессов развития хламидийной инфекции, которые сегодня остаются одной из интереснейших загадок современной внутриклеточной паразитологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

C. trachomatis – наиболее часто передающийся половым путем возбудитель, вызывающий человека трахому, паховый лимфогранулематоз урогенитальные инфекции, часто сопровождающиеся серьезными Механизмы взаимодействия облигатного осложнениями. данного внутриклеточного паразита с клеткой-хозяином на сегодняшний день остаются практически неизвестными. Согласно принятой точке зрения, главная роль в данных взаимодействий может принадлежать реализации уникальным хламидийным белкам, среди которых особенно пристальное исследователей привлекают белки мембраны включения.

В настоящей работе впервые показана локализация шести Inc-белков C. trachomatis при экспрессии кодирующих их генов в эукариотической клетке с образованием составных белков с GFP, а так же ко-локализация данных белков с известными органеллами эукариотической клетки, относящимися к ее секреторному пути. Для IncA C. trachomatis подтверждена ранее описанная локализация в области ЭПР. Показанная нами зависимость распределения составных белков в клетке от расположения репортера предполагает наличие у белков *C*. trachomatis специфических данных последовательностей, обеспечивающих ИХ взаимодействие с эукариотическими Влияние таксола на распределение составного белка GFP-IncC в клетке может считаться аргументом в пользу гипотезы об его адресной доставке к плазматической мембране с помощью секреторного пути клетки. Мы предполагаем, что разработанная нами модельная система экспрессии Іпсбелков в эукариотической клетке может быть использована в дальнейшем для изучения как функций Іпс-белков, так и основных аспектов взаимодействий хламидий с клеткой-хозяином.

Так же разработана методика получения и очистки полноразмерных рекомбинантных белков мембраны включения *C. trachomatis*. получены рекомбинантные полноразмерные IncB И IncC. так специфические антитела к ним, которые в дальнейшем могут быть использованы для выявления белков-партнеров в экспериментах in vitro. При исследовании генетического полиморфизма генов, кодирующих Іпс-белки С. trachomatis, показана высокая консервативность incB и incC, что может служить подтверждением значимости кодируемых белков ИМИ ДЛЯ развития хламидийной инфекции.

ВЫВОДЫ

- 1. Изучен полиморфизм генов incA, incB, incC, incD, incE, incF и incG у 8 клинических изолятов C. trachomatis. В кодирующих последовательностях генов incB и incC не обнаружено значащих нуклеотидных замен. В последовательности гена incA у 2 изолятов обнаружена одна значащая нуклеотидна замена (665 $G \rightarrow A$), ранее описанная в литературе. В последовательностях генов incD, incE, incF и incG было обнаружено от 2 до 13 значащих нуклеотидных замен у различных клинических изолятов.
- 2. Клонированы гены incA, incB, incC, incD, incE, incF и incG C. trachomatis в плазмидные векторы pEGFP-N1 и pEGFP-C1 для получения составных белков с GFP при их экспрессии в линиях клеток млекопитающих.
- 3. Впервые определена локализация белков IncA, IncB, IncC, IncD, IncE, IncF и IncG *C. trachomatis* при экспрессии кодирующих их генов в клетках линии HeLa.
- 4. Впервые определена ко-локализация белков мембраны включения IncC, IncD, IncE, IncF и IncG *C. trachomatis* с клеточными органеллами при экспрессии кодирующих их генов в клетках линии HeLa и показана ее

- зависимость от времени после трансфекции. Для IncA подтверждена колокализация с эндоплазматическим ретикулумом.
- 5. Показано изменение распределения составного белка GFP-IncC под воздействием таксола, что свидетельствует о вовлечении микротрубочек в процесс транспорта данного белка.
- 6. Клонированы гены *incB* и *incC C. trachomatis* в плазмидные векторы pET-15b и pET-32a для последующей экспрессии в клетках *E. coli*.
- 7. Подобраны и оптимизированы условия получения составных рекомбинантных белков TrxA-IncB и TrxA-IncC в клетках *E. coli*, процедура их выделения, очистки и разделения.
- 8. Впервые получены полноразмерные рекомбинантные белки IncB и IncC C. trachomatis и специфические кроличьи поликлональные антитела к ним.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1. Кострюкова Е.С., Коробова Ф.В., Лазарев В.Н., Шкарупета М.М., Титова Г.А., Акопиан Т.А., Говорун В.М. Локализация Іпс-белков *С. trachomatis* при экспрессии их генов в культуре клеток линии HeLa // Бюлл. экспер. биол. мед. 2005. T. 139, №5, C. 562 567.
- 2. Кострюкова Е.С., Коробова Ф.В., Лазарев В.Н., Шкарупета М.М., Титова Г.А., Акопиан Т.А., Говорун В.М. Клонирование и экспрессия генов белков мембраны включения C. trachomatis в культуре клеток HeLa // Материалы международной школы-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинженерия» 2005, Москва C. 182.
- 3. Кострюкова Е.С., Лазарев В.Н., Титова Г.А., Акопиан Т.А., Левицкий С.А., Говорун В.М. Экспрессия генов белков мембраны включения IncB и IncC *Chlamydia trachomatis* в *Escherichia coli*. // Биохимия 2006. Т.71, №3, С. 333-340.
- 4. Lazarev V.N., Shkarupeta M.M., Kostryukova E.S., Levitskii S.A., Basovskii Yu.I., Govorun V.M. Analysis of *Clamydia trachomatis* Inc-proteins cellular localization during expression of their genes in HeLa cell line. // Genomic Perspectives to Host Pathogen Interactions 2006, Hinxton, UK P. 47.

Список используемых сокращений

ERGIC - ER-Golgi intermediate compartment, ЭПР-Гольджи промежуточный компартмент

GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцирующий белок

Inc-белки – inclusion membrane protein, белки мембраны включения

TrxA – тиоредоксин A

WGA - wheat germ agglutinine, пшеничный зародышевый агглютинин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

пн – пара нуклеотидов

ЭПР – эндоплазматический ретикулум