

На правах рукописи

МОМЫНАЛИЕВ Куват Темиргалиевич

**Геномно-протеомная характеристика variability
*Helicobacter pylori***

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Москва - 2009

Работа выполнена в лаборатории постгеномных исследований в биологии
ФГУ научно-исследовательского института Физико-Химической Медицины
Минздравсоцразвития России

Научный консультант:

доктор биологических наук,
профессор

Вадим Маркович Говорун

Официальные оппоненты:

академик РАН, доктор биологических наук,
профессор

Николай Александрович Колчанов

член-корреспондент РАМН, доктор биологических наук,
профессор

Георгий Борисович Смирнов

доктор биологических наук,
профессор

Николай Николаевич Соколов

Ведущая организация: Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова

Защита диссертации состоится «14» мая 2009 года в ____ часов на заседании
Диссертационного совета Д 001.010.01 при НИИ биомедицинской химии
им. В.Н. Ореховича РАМН по адресу: 119121, г. Москва, Погодинская ул., д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ биомедицинской химии
им. В.Н. Ореховича РАМН

Автореферат разослан « ____ » _____ 2009 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук

Елена Анатольевна Карпова

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Helicobacter pylori – грамотрицательная, микроаэрофильная бактерия, колонизирующая слизистую оболочку желудка и ассоциированная с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, атрофическими гастритами, аденокарциномой или экстранодальной В-клеточной MALT-лимфомой (Mucosa Associated Lymphoid Tissue). *H. pylori* является одним из самых распространенных возбудителей инфекционных заболеваний. Согласно некоторым оценкам, более половины населения мира инфицированы этим микроорганизмом. Инфекция *H. pylori* часто не имеет клинических проявлений. Только у определенной части инфицированных (10–15%) с течением времени появляются клинически значимые симптомы болезни: развивается хронический гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, рак желудка. В 2005 г. первооткрыватели бактерии, Робин Уоррен (Robin Warren) и Барри Маршалл (Barry Marshall), были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине «за открытие бактерии *Helicobacter pylori* и ее роли в развитии гастрита и язвы желудка» (Marshall, Warren, 1984; Warren, 1983; Marshall, 1996).

Интенсивное изучение *H. pylori* показало, что у 80% больных, страдающих раком желудка, в анамнезе была зафиксирована инфекция *H. pylori* (Peterson, 1991; Parsonnet, 1994; Forman, 1991; Watanabe, 1997; Correa, 1996; Peek, 2001). Это явилось одной из причин, по которым в 1995 г. Международная ассоциация по изучению рака (IARC, ВОЗ), признала *H. pylori* канцерогеном 1-го класса. Эпидемиологические и серологические исследования показали, что клиническая картина заболеваний, вызываемых *H. pylori*, во многом зависит от факторов вирулентности, таких как CagA, VacA, IceA и BabA. Однако тесной связи между определенным генотипом *H. pylori* (различные комбинации аллелей *vacA*, *cagA*, *babA* и *iceA*) и клиническими формами заболеваний желудочно-кишечного тракта пока не обнаружено. С другой стороны, классификация *H. pylori*, проведенная с помощью различных методов (вычитающая гибридизация, амплификация со случайными праймерами, пульс-электрофорез), выявила значительную межштаммовую гетерогенность этой бактерии и показала, что каждый инфицированный индивид является носителем уникального штамма *H. pylori*.

В отличие от многих других бактерий, в изолятах *H. pylori* идентичные аллели генов очень редко встречаются. Экстраординарная генетическая гетерогенность *H. pylori* впервые показана Кансау и соавт. в 1996 г. Было продемонстрировано, что среди 29 клинических штаммов *H. pylori* нуклеотидная последовательность *ureC* является уникальной для каждого штамма. В настоящее время уникальность нуклеотидных последовательностей в *H. pylori* подтверждена на большом количестве генов: *cagA*, *vacA*, *flaA*, *flaB*, *cysS*, *ureI*, *trpC* и др. Приблизительно 5%-ая нуклеотидная дивергенция обычно наблюдается для большинства генов между парой неродственных *H. pylori* штаммов (Wang, 1999; Suerbaum, 1998). Для сравнения, гомология ДНК между *Salmonella typhimurium* и *Salmonella typhi* составляет ~98–99% и ~85% между *S. typhimurium* и *Escherichia coli*. С помощью ДНК-матриц показано, что уровень макровариабельности генома *H. pylori* на уровне генов может достигать до 25–30% от всех ОРС (Salama et al. 2000; Gressmann et al. 2005; Han et al. 2007).

Таким образом, в данное время сложилась парадоксальная ситуация, когда значительная генетическая вариабельность и разнообразие *H. pylori* достоверно зарегистрированы, а механизмы, обеспечивающие это разнообразие и его значение в процессе адаптации к хозяину и патогенезе, еще не полностью раскрыты. Очевидный дефицит генов в геноме *H. pylori*, участвующих в процессах рекомбинации/репарации, предполагает вероятное объяснение генетического разнообразия высокой скоростью

мутаций, но только немногие из генов, участвующие в этих процессах функционально охарактеризованы. Также необходимо признать, что причины, обуславливающие почему *H. pylori*, которая обладает естественной компетентностью, способна импортировать только небольшие фрагменты чужеродной ДНК, неизвестны. Скорость дивергенции *H. pylori* внутри организма хозяина также остается предметом острых дискуссий. Если по данным Д. Фалуша и его коллег (2001) штаммы *H. pylori* последовательно выделенные от одного пациента через определенные промежутки времени, варьируют достаточно сильно, то А. Лундин (2005) показал, что последовательно выделенные штаммы изменяются незначительно или вообще не меняются, по крайней мере за 9 лет.

Поэтому поиск естественных причин, обуславливающих гетерогенность штаммов *H. pylori*, является актуальной задачей, решение которой позволит проследить зависимость между генетической вариабельностью и выживаемостью бактерии в организме индивидуального хозяина и развитием патологических процессов на слизистой оболочке желудка.

Цели исследования

Оценка структурной и функциональной вариабельности штаммов *H. pylori*, выделенных на территории России и поиск возможных причин изменчивости бактерии.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать аллельную гетерогенность штаммов *H. pylori*, выделенных у пациентов, живущих на территории России.
2. Разработать ДНК-макроматрицы *H. pylori* для проведения сравнительного геномного и транскрипционного анализа клинических штаммов *H. pylori*.
3. Разработать алгоритм поиска горизонтально перенесенных генов в геноме *H. pylori* на основе гауссовской статистики.
4. Охарактеризовать функциональную гетерогенность *H. pylori* штаммов при раннем раке желудка и хроническом гастрите и реконструировать молекулярно-генетические взаимодействия дифференциально экспрессирующихся белков *H. pylori* при этих заболеваниях.
5. Разработать методику оценки степени метилирования генома *H. pylori* на основе ДНК-макроматриц и белка Каизо (Kaiso).
6. Оценить «вклад» процессов метилирования-дезаминирования ДНК в генетическую вариабельность *H. pylori*.
7. Разработать микрофлюидный чип для мониторинга жизнедеятельности единичных клеток в бактериальной популяции.

Научная новизна

— Впервые определена популяционная принадлежность штаммов *H. pylori* на территории России. Показано, что штаммы *H. pylori*, выделенные от европейцев, принадлежат к одной европейской (hpEurope) популяции. Среди штаммов *H. pylori*, выделенных от представителей различных этнических групп, проживающих компактно на Азиатской территории России, обнаружена новая субпопуляция *H. pylori* – hspSiberia, входящая в популяцию hpEastAsia. Также среди выделенных образцов встречались изоляты *H. pylori*, принадлежащие к субпопуляции hspAmerind. Ранее *H. pylori* с этим гаплотипом была выделена от индейцев Северной Америки. Полученные данные позволили предположить пути распространения бактерии в Америку через Аляску.

— Впервые описана функциональная гетерогенность *H. pylori* штаммов при раннем раке желудка и хроническом гастрите и проведена реконструкция молекулярно-генетических взаимодействий дифференциально экспрессирующихся белков *H. pylori* при этих заболеваниях. Показано, что основную часть вариабельных белков при адаптации бактерии к

новым условиям в биологической нише составляют белки-антиоксиданты, белки цикла трикарбоновых кислот и белки теплового стресса, при этом выброс генов и мутации в них не являются приспособительными реакциями *H. pylori* в этих условиях.

— Для оценки функциональной вариабельности *H. pylori* популяции разработан микрофлюидный чип, выполненный из оптически проницаемого полиметилметакрилата, состоящий из сети микрофлюидных каналов с ячейками, ввод пробы в которые осуществляется с помощью перистальтического насоса.

— Впервые был проведен сравнительный анализ геномов рифампицинустойчивых штаммов *H. pylori*. Показано, что при адаптации бактерии к антибиотику происходит накопление мутаций, не связанных и/или не обеспечивающих антибиотикоустойчивость. Предполагается, что обнаруженные мутации в рифампицинустойчивых *H. pylori* штаммах являются следствием отбора гипермутабельных клеток.

Практическая значимость

Для практического использования разработан способ определения степени метилирования генома *H. pylori* на основе ДНК-макроматриц и белка Каизо. Данный подход может быть использован для оценки степени метилирования генома других бактерий. Были сконструированы рекомбинантные плазмиды для клонирования промоторных областей генов и разработана методика инактивации генов в *H. pylori*. Для проведения сравнительного геномного и транскрипционного анализа клинических штаммов *H. pylori* были сконструированы ДНК-макроматрицы. Разработанные методики могут быть использованы для поиска новых факторов вирулентности *H. pylori*.

Для предсказания горизонтально перенесенных генов (штаммоспецифических) в геноме *H. pylori* был разработан алгоритм учитывающий корреляцию между компонентами вектора атрибутов и базирующийся на робастном методе. Точность предсказания чужеродных генов с помощью этого метода составила 99%. Кроме того, в 25–40% случаях разработанный классификатор правильно определял источник добавленных генов. Разработанный алгоритм может быть использован для поиска чужеродных генов в других микроорганизмах.

Для мониторинга жизнедеятельности единичной бактериальной клетки был разработан микрофлюидный чип, элементом которой являются единичные клетки, несущие рекомбинантные плазмиды с репортерной системой на основе GFP белка и промоторными областями генов в качестве сенсоров. Результаты исследований использовались при выполнении работ по Государственному контракту с Федеральным агентством по науке и инновациям № 02.447.11.3003 «Разработка биологических датчиков, созданных на основе микроорганизмов с ограниченной емкостью генома, для диагностики патологий человека» и № 02.512.11.2038 «Эпигенетические факторы регуляции вирулентности патогенного микроорганизма *Helicobacter pylori*».

Теоретические положения и результаты диссертационной работы используются в курсах лекций по молекулярной медицине в Московском Физико-Техническом институте и Российском государственном медицинском университете. По результатам работ поданы заявки на патент на изобретение: «Бактериальный сенсор для диагностики» (№ заявки 2008127479), «Способ масштабной оценки частоты транзиций в сайтах метилирования бактерий» (№2008127480), «Способ предсказания чужеродных генов в бактериях» (№2008127481) и «Способ раздельного выделения одно- и двунитевых нуклеиновых кислот на силикатных матрицах» (№2008137197). Разработаны и внедрены в серийное производство диагностические ПЦР-наборы (НПФ «Литех», г.Москва) для генотипирования *H. pylori* в биопсиях слизистой оболочки желудка: «Хеликопол СА», «Хеликопол ВА», «Хеликопол ІА», «Хеликопол ВА».

Апробация результатов работы. Основные результаты работы были представлены на научных конференциях и симпозиумах, в том числе: 11-м симпозиуме Международного общества по микробной экологии (ISME) в 2006 г, 4-м Международном семинаре «Российские технологии для индустрии» (Санкт-Петербург, 2000 г), международных конференциях Европейской группы по изучению хеликобактера (Рим, 2001 г; Стокгольм, 2003 г., Рига, 2008 г.), 4-й Международной конференции Организации «Протеом человека» (Мюнхен, 2005 г.), 1-й и 2-й Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2004 г, 2008 г), Российских национальных конгрессов "Человек и лекарство" (Москва 2003 г., 2004 г). За работу «Сравнительный анализ транскрипционных профилей штаммов *Helicobacter pylori*» в 2005 г. была присуждена премия ООО МАИК «Наука/Интерпериодика» за лучшую публикацию в издаваемых ею журналах.

Материалы диссертационной работы отражены в 31 публикации: 18 статьях и 13 материалах российских и международных научных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 242 страницах, содержит 50 рисунков и 36 таблиц. Список литературы включает 426 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы H. pylori и их культивирование

Лабораторные штаммы *H. pylori* 26695 (№ ATCC 700392) и J99 (№ 700824) были любезно предоставлены проф. М. Ахтманом. (Институт инфекционной биологии им. Макса Планка, Германия). Клинические штаммы *H. pylori* выделяли из биопсийного материала (биопсии слизистой оболочки антрального отдела желудка), полученного от пациентов европеоидной расы с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и хроническим гастритом из Москвы и Московской области, Красноярска, Уфы, Казани, Новосибирска, Ярославля, Ростова-на-Дону и Санкт-Петербурга, а также из биопсийного материала полученного в ходе профилактического осмотра (с информированного согласия) представителей народностей теленгитов, бурятов, чукчей, эвенов, эвенков, кетов, хантов, коряков, удегейцев, монголов, нанайцев, ненцев, нивхов, тувинцев и якутов. Штаммы *H. pylori* от пациентов с ранним раком желудка (РР) и хроническим гастритом (ХГ) выделяли совместно с д.м.н. С.В. Кашиным (Областная онкологическая больница г. Ярославля). Всего в ходе работы было выделено 619 клинических штаммов *H. pylori*.

Биопсийный материал высевали на среду *Pylori* (BioMerieux, Франция). Клинические изоляты *H. pylori* и лабораторные штаммы 26695 и J99 культивировали на плотной питательной среде, содержащей Колумбийский агар (BioMerieux, Франция), 10% инактивированной лошадиной сыворотки (РАА Lab., Австрия), 5% дрожжевого диализата (ГУ НИИ ЭиМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН) и селективную смесь антибиотиков «Dent» (Oxoid, Англия) в анаэробных условиях с газогенерирующими пакетами для культивирования микроаэрофилов (BBL, Campy Pak Plus, Becton Dickinson, США) при +37°C. Морфологически сходные культуры *H. pylori* идентифицировали с помощью уреазного, оксидазного и каталазного тестов.

Мультилокусное секвенирование штаммов H. pylori

Мультилокусный гаплотип клинических штаммов *H. pylori* устанавливали по нуклеотидным вариациям *atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI* и *yphC* генов (Achtman M., 1999). Геномную ДНК *H. pylori* выделяли коммерческим набором Jetflex Genomic DNA Purification Kit (Genomed, Germany). Определение нуклеотидной последовательности ДНК осуществляли

при помощи набор BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США) и капиллярного анализатора ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Данные мультилокусного секвенирования анализировали, с помощью программы MEGA 3.1 и Structure v2.0 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/>), в которой применен байесовский подход для определения структуры популяции. Для анализа использовали "по-ad-mixture" модель, предполагающую, что каждый штамм является потомком одной из N числа популяций и характеризуется определенными частотами встречаемости аллелей каждого локуса. Для мультилокусного секвенирования *H. pylori* изолятов использовали стандартные праймеры

Создание ДНК-макроматриц H. pylori

Подбор олигонуклеотидных праймеров для амплификации 1621 открытых рамок считывания генома (ОРС) *H. pylori* осуществляли с помощью программы ArrayDesigner II (Premier Biosoft International, США) на основе нуклеотидной последовательности генома *H. pylori* (GenBank Ac. № NC_000915). Амплификацию проводили в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 10 mM Tris/HCl, pH 8.8, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl и 0.1% Triton X-100, 1 U Taq полимеразы, 0.2 mM каждого dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 пмоль каждого праймера, 0.8 нг геномной ДНК лабораторного штамма *H. pylori*, в амплификаторе PTC-225 (MJ Research, США). Далее неочищенные ПЦР продукты наносили на 22 см × 22 см сухие нейлоновые мембраны Hybond N+ (Amersham Biosciences, Великобритания) с помощью автоматического репликатора QPix-2 (Genetix, Великобритания) в конфигурации 4×4. Перед нанесением 30 мкл ПЦР-продуктов разбавляли 5.3 мкл 20× SSC. В качестве контроля гибридизации на мембрану наносили геномную ДНК *H. pylori* 26695 в шести разведениях (250 пг/мкл, 125 пг/мкл, 62.5 пг/мкл, 31.25 пг/мкл, 15.6 пг/мкл, 7.8 пг/мкл). После нанесения, мембраны помещали на 3М бумагу, смоченную 0.4N NaOH, 3M NaCl, на пять минут для денатурации ПЦР продуктов, затем мембрану переносили в ванночку с 6× SSC на пять минут для нейтрализации щелочи. Для фиксации ДНК мембраны выдерживали два часа при температуре 80°C. Конечным продуктом являлась нейлоновая мембрана размером 7×12 см, с иммобилизованными на ней в определенном порядке 1590 ПЦР-продуктами в двух повторях.

Геномное сканирование и транскрипционное профилирование клинических штаммов H. pylori

Хромосомную ДНК (25 нг) предварительно метили [α -³³P]dATP (3000 Ки/ммоль) с использованием набора Megaprime DNA Labelling Systems (Amersham Biosciences) Тотальную РНК выделяли из клинических изолятов *H. pylori* с помощью ToTALLY RNA Kit (Ambion, США). мРНК выделяли из двух независимых культивирований каждого клинического изолята *H. pylori* и использовали в дальнейшем для независимого синтеза кДНК и гибридизации. Меченую кДНК получали с помощью набора cDNA Strip-EZ RT (Ambion) и набора специфических олигонуклеотидов AR-OLHP-RT (Eurogentec), реакционная смесь содержала 1 мкг тотальной РНК и [α -³³P]dATP (3000 Ки/ммоль). Невключившуюся метку удаляли с помощью ProbeQuant G-50 колонок («Amersham»).

Гибридизацию геномной ДНК, выделенной из штаммов на ДНК-макроматрицах проводили в 5 мл свежего 1× гибридизационного буфера, содержащего 5.5×10^6 ипм/мин/мл ДНК зонда в течении 20 часов при 65°C. После гибридизации ДНК-макроматрицы последовательно промывали в 2× SSC, 0.1% SDS, затем 20 мин при 65°C этом же буфере и в 0.2× SSC, 0.1% SDS at 65°C в течение 1 ч. ДНК-макроматрицы экспонировали в течение 48 ч с накопительным экраном (Molecular Dynamics, США), а затем сканировали с помощью Storm 820 (Molecular Dynamics) с разрешением 50 мкм.

Результаты гибридизации анализировали с использованием программы ImageQuant software 5.1 (Molecular Dynamics), J-Express 2.1 (MolMine AS, Норвегия) и Statistica (StatSoft, США).

Дифференциальный двухмерный гель-электрофорез H. pylori изолятов

Клеточный осадок (10 мкл) растворяли в буфере: 7М мочевины, 2М тиомочевина, 4% CHAPS, 30 mM Tris-HCl, pH 8.5. Концентрацию белков определяли с помощью Quick start Bradford реагентов (Bio-Rad, США) и выравнивали образцы по белку 2 мг/мл. 50 мкг образцов метили 400 пМ Cy3 или Cy5 CyDye DIGE Fluor флуоресцентными красителями (Amersham Biosciences) согласно протоколу производителя. Далее полученные образцы смешивали в равных объемах со 100 mM DTT (Bio-Rad, США) и 2% (o/o) Ampholine 3-10 (Bio-Rad).

В первом направлении (изоэлектрофокусирование) использовали 4% ПААГ, 9М мочевины и 4% Амфолины (Pharmacia) pH 3-10, либо ИПГ стрипы 3-10 (Bio-Rad). Изоэлектрофокусирование проводили 14000 Вч по заданной программе (2ч-250В, 2ч-450В, 14ч-900В). После проведения изоэлектрофокусирования ИПГ-стрипы или гели вымачивали в растворе, содержащем 125 mM Tris-HCl, 40% (v/o) глицерин, 3% (v/o) ДДС, 65 mM ДДТ, pH 6.8 в течение 15 мин. После этого гель с фокусированными белками переносили во второй полиакриламидный гель с градиентом пористости ПААГ 9–16% и разделяли белки во втором направлении в присутствии 0.1% ДСН. Далее гели сканировали с помощью Typhoon Trio Imager (Amersham Biosciences) с разрешением 200 мкм и анализировали с помощью программы PDQuest (Bio-Rad). Дифференциально экспрессированные белковые пятна вырезали из геля, подвергали трипсинолизу и наносили на твердую подложку чипа фирмы Bruker Daltonics, смешивая их с раствором коричной кислоты в этаноле, содержащем 0.1% ТФУ.

Идентификация белков производилась методом пептидного фингерпринта с использованием программного пакета Mascot. Масс-спектры пептидов снимались на приборе MALDI-TOF REFLEX III Bruker Daltonics.

Для верификации данных, полученных с помощью кДНК-макроматриц и протеомики, использовали ПЦР в режиме реального времени.

Микрофлюидный клеточный сенсор

Кодирующая часть гена *gfp* была получена путём обработки плазмиды pEGFP (Clontech, США) эндонуклеазами рестрикции NotI и NcoI (Fermentas, Литва) и после обработки T4 ДНК полимеразой (Fermentas, Литва) клонирована в плазмиду pHel2, обработанную рестриктазой Ecl136II (Fermentas, Литва). В полученную плазмиду pHel2-promotorlessGFP по сайту узнавания рестриктазы BglII (Fermentas, Литва) были встроены комплементарные друг другу олигонуклеотиды 5'-gatcggatccgagctcccgga и 5'-gatctcccgaggatcggatcc, содержащие дополнительные сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции BamHI, Ecl136II, SmaI и BglII с образованием плазмиды pHel2-MCS-promotorlessGFP.

Предполагаемые промоторные области генов *sodB*, *flgB*, *rocF*, *ansB* были выбраны, исходя из анализа нуклеотидных последовательностей соответствующих межгенных областей *H. pylori* штамма 26695. Полученные фрагменты были обработаны эндонуклеазой рестрикции BglII и клонированы в плазмиду pHel2-MCS-promotorlessGFP, также обработанную эндонуклеазой рестрикции BglII, с образованием плазмид pHel2-sod-GFP, pHel2-flg-GFP, pHel2-roc-GFP, pHel2-ans-GFP. Рекомбинантные плазмиды были получены с использованием штамма *E. coli* DH5α. Полученными плазмидами был трансформирован клинический штамм A45 *H. pylori*: 2–5 мкг плазмидной ДНК добавляли к суспензии

10⁹ клеток, смесь каплями наносили на поверхность твёрдой питательной среды, через двое суток клетки пересевали на селективную среду, содержащую 8 мкг/мл хлорамфеникола.

Использованный в работе микрофлюидный чип (длина, ширина: 61 × 22 мм) состоял из 5 независимых дорожек, каждая из которых имеет 4 канала (диаметр 50 мкм), содержащих по 20 ячеек (ширина, длина, высота: 100 × 100 × 50 мкм). Чип был сделан из полиметилметакрилата (PMMA) методом фотолитографии с последующим термическим связыванием поверхностей. Производство чипов заказывали в компании Epigem (Великобритания). Микрофлюидный чип с помощью пластиковых коннекторов крепится на платформе (Epigem, Великобритания), позволяющей осуществлять ввод пробы с помощью перистальтического насоса 2232 Microperpex S (LKB Bromma, Швеция).

Сеть микрофлюидных каналов промывали 1× PBS буфером (pH 7.4; KH₂PO₄ 1.7 mM, NaH₂PO₄ 5.2 mM, NaCl 15 mM), вводили раствор PBS, содержащий Lectin tetragonolobus, Lectin *T. vulgaris*, Concanavalin A, Fibronectin по 50 нг/мл (Sigma, США) и оставляли на ночь при комнатной температуре. Затем микрофлюидные каналы промывали 1× PBS, вводили суспензию клеток *H. pylori* и инкубировали в течение 3 часов при 37°C. Неприкреплённые клетки смывали средой ВНИ.

Анализ клеток проводили с помощью флуоресцентного конфокального микроскопа Nikon Eclipse E800 (Nikon, Япония), оборудованного аргоновым лазером 488 нм. Спектры эмиссии регистрировали в диапазоне 522±35 нм. При сравнительном анализе штаммов, содержащих разные рекомбинантные плазмиды, все параметры сканирования оставались неизменными. В работе использовались объектив Plan Fluor ELWD 40×/0.60 и 10×/0.60. Интенсивность флуоресценции оценивалась с помощью программы обработки изображений ImageJ (NIH, США).

Скрининг мутаций в рифампицинустойчивых штаммах H. pylori

Определение нуклеотидной последовательности геномной ДНК *H. pylori* 26695 (26695m) и двух рифампицинустойчивых штаммов P1 и P2, сборка генома и анализ мутаций был выполнен компанией 454 Life Sciences (Branford, США). Подбор олигонуклеотидных праймеров для подтверждения найденных мутаций в *H. pylori* 26695 и двух рифампицинустойчивых штаммах осуществляли с помощью программы ArrayDesigner II (Premier Biosoft International, США) на основе нуклеотидной последовательности генома *H. pylori* 26695. Определение нуклеотидной последовательности ДНК осуществляли при помощи наборов BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США) и капиллярного анализатора ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) согласно инструкциям фирмы-производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Макро- и микровариабельность *H. pylori*

1.1. Аллельная гетерогенность штаммов *H. pylori*. В настоящее время географическое разделение показано для многих патогенов человека, включая вирус JC, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*. Генетическая гетерогенность *H. pylori* в пределах вида намного выше, чем для большинства других бактерий и в 50 раз выше, чем у человека. Этот факт, а также высокая частота рекомбинации между различными штаммами *H. pylori*, позволяют использовать распределение полиморфных нуклеотидов в геноме в качестве маркеров для популяционно-генетического анализа.

Результаты мультилокусного секвенирования российских штаммов *H. pylori*, выделенных на Европейской территории РФ, анализировали совместно с данными, полученными для 370 штаммов *H. pylori*, ранее выделенными д-ром Линц Б. (Институт инфекционной биологии им. Макса Планка, Германия) от представителей различных этносов

мира и разделенными на четыре популяции: hpAfric1, hpAfrica2, hpEastAsia и hpEurope. Принадлежность бактериальных штаммов к тем или иным популяциям определяли на основании распределения полиморфных нуклеотидов (1418) всех 392 штаммов. Программа Structure v2.0 предлагает эвристическую оценку вероятности существования N числа популяций ($N = 2, 3, 4...$), в результате сравнения которых принимается решение об их истинном количестве. Мы проанализировали возможность существования от 2 до 10 бактериальных популяций. Наиболее вероятным оказалось существование четырех ($N = 4$) популяций, структура которых сохранялась при различном количестве прогонов программы (от 2 до 14).

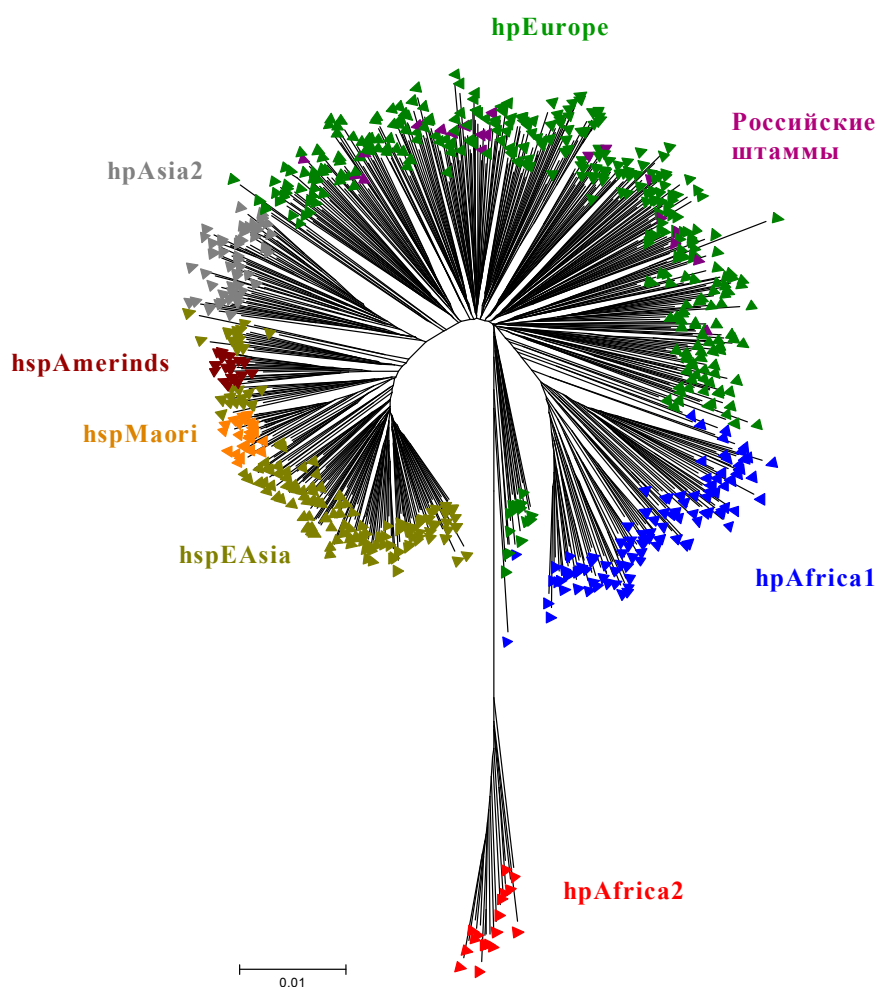


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное с учетом мультилокусных гаплотипов штаммов *H. pylori*, выделенных на Европейской территории России

Результаты проведенного исследования показали, что все штаммы *H. pylori*, выделенные на Европейской территории России, принадлежат к одной европейской (hpEurope) популяции (рис. 1). Попытки разделения этого кластера на субпопуляции не увенчались успехом. При моделировании двух или четырех субпопуляций изоляты

последовательно подразделялись на одни и те же группы (в случае предположения трех субпопуляций – одна из них не содержала никаких штаммов). Тем не менее, географической зависимости подобного разделения выявлено не было.

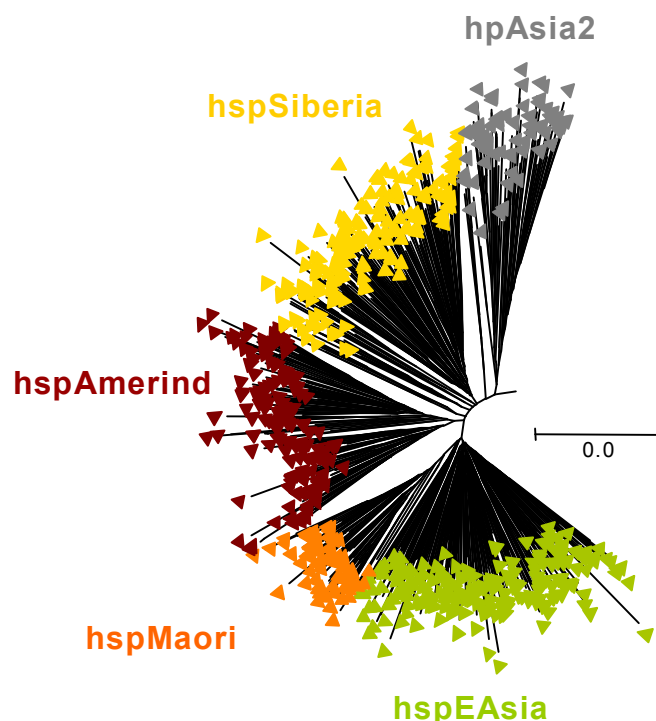


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное с учетом мультилокусных гаплотипов 347 штаммов *H. pylori*, выделенных на Азиатской территории России

О принадлежности штаммов *H. pylori*, выделенных в России, к европейской популяции свидетельствует распределение в их геноме прародительских нуклеотидов. Ранее было показано существование нескольких прародительских популяций *H. pylori*: предковые Africal, Africa2, EastAsia, Europe1 (AE1) и Europe2 (AE2). По-видимому, штаммы *H. pylori*, выделенные в современной Европе, являются рекомбинантами между бактериями популяций AE1 и AE2. Предполагается, что микроорганизмы этих популяций попали в Европу из различных источников: *H. pylori* популяции AE1 — преимущественно из Центральной Азии, AE2 — из Ближнего Востока и Северной Африки. Следует отметить, что нет ни одного изолята из Европы, геном которого содержал бы более 80% прародительских нуклеотидов одной из популяций AE1 и AE2. Это соотношение характерно и для проанализированных нами российских штаммов *H. pylori*, причем доли предковых европейских популяций распределены в них равномерно.

На следующем этапе работы для выявления основных путей распространения *H. pylori* нами были проанализированы штаммы *H. pylori*, выделенные от различных этнических групп проживающих компактно на Азиатской территории России (<http://maps.yandex.ru/russia?upoint=657989278887>). Работа была проведена совместно с д-ром Маади А. (Республиканская больница № 1 г. Кызыла, Тува), проф. Ахтманом М. (Институт окружающей среды, Ирландия) и д-ром Мудли Й. (Институт инфекционной биологии им.

Макса Планка, Германия). В результате проведенной работы нами обнаружена новая субпопуляция hspSiberia *H. pylori*, входящая в популяцию hpEastAsia (рис. 2). Изоляты *H. pylori* с этим гаплотипом были найдены во всех выделенных группах (всего 141 изолят). Кроме того, довольно часто среди выделенных образцов встречались изоляты *H. pylori*, принадлежащие к субпопуляции hspAmerind (174 изолят). Ранее *H. pylori* с этим гаплотипом были выделены от индейцев Северной Америки. Полученные данные позволили предположить пути миграции бактерии в Америку через Аляску.

1.2. Структурная макрогетерогенность *H. pylori*

*Разработка ДНК-макроматриц *H. pylori*.* Для изучения структурной гетерогенности изолятов *H. pylori* был разработан метод полногеномного сканирования на ДНК-макроматрицах. Суть метода заключается в иммобилизации интересующих фрагментов известного генома *H. pylori* на твердой подложке и проведении гибридизации, где в качестве зонда используется меченая ДНК исследуемого штамма микроорганизма (рис. 3).



Рис. 3. Фрагмент гибридизационной картины полногеномной ДНК-макроматрицы *H. pylori*

Оценку ложно-положительных результатов проводили с помощью гибридизации с геномной ДНК штамма J99. Гены, для которых интенсивность сигнала уменьшалась более чем в два раза в экспериментальных штаммах по сравнению с контрольным штаммом, считали отсутствующими. Помимо генов, входящих в функциональное ядро, были получены два неспецифических сигнала, характерные для штамма 26695, что может быть обусловлено перекрестной гибридизацией между геномной ДНК штаммов J99 и 26695. Частота ложно-положительных сигналов составила 1.6 %.

*Геномное сканирование клинических штаммов *H. pylori*.* Изучена генетическая гетерогенность 17 выделенных штаммов *H. pylori* с помощью разработанной ДНК-макроматрицы. Генный состав *H. pylori* штаммов сравнивали с опубликованной нуклеотидной последовательностью генома *H. pylori* 26695. Показано, что 1272 гена (81% всего генома) встречаются во всех штаммах и образуют функциональное ядро генома (рис. 4). Выявлены также 293 штаммоспецифические ОРС (18.7%), нуклеотидные

последовательности которых в исследованных штаммах *H. pylori* значительно варьируют. Необходимо отметить, что гомология между 293 штаммоспецифическими ОРС с аналогичными ОРС геномов *H. pylori* J99 и 26695 составляла 83–98%. Среди штаммоспецифических генов *H. pylori* наиболее представлены ОРС с неизвестными функциями, их доля 71%. Среди остальных штаммоспецифических генов можно выделить гены, регулирующие обмен ДНК между бактериями (системы рестрикции-модификации; гены, участвующие в транспозиции), а также гены, мембранных белков. Доля генов рестрикции-модификации составляет 3–9%, генов транспозиции 2–4% и генов, кодирующих белки внешней мембраны 2–4% от всех штаммоспецифических генов.

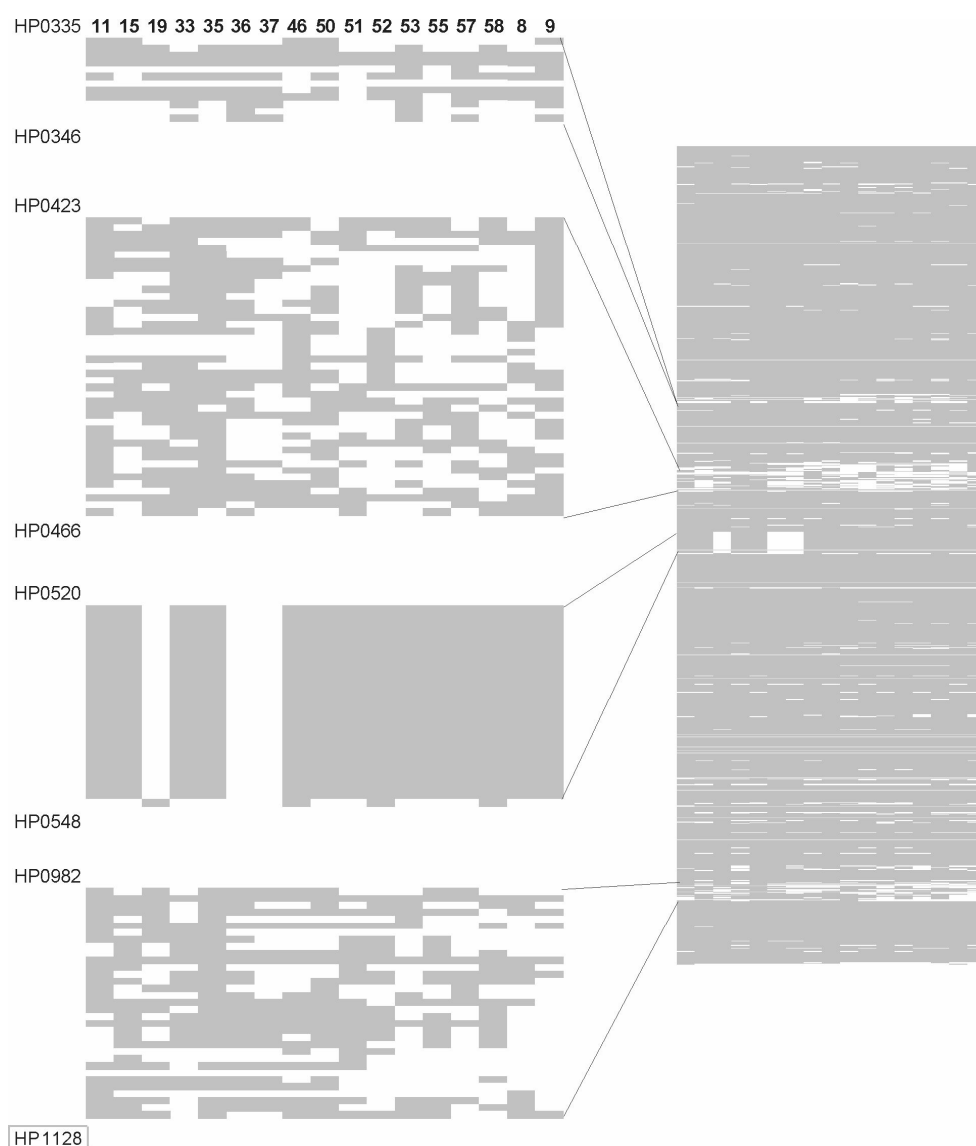


Рис. 4. Геномное сканирование штаммов *H. pylori*.

Слева – увеличенное изображение некоторых участков сканограммы. Состав (G+C): HP0335-HP0346 –38.4%; HP0423-HP0466 – 33.3%; HP0520-HP0548 – 35.6%; HP0982-HP1028 – 33.2%. Наличие гена отмечено серым цветом, отсутствие – белым.

Штаммоспецифические гены локализованы, в основном в трех достаточно протяженных участках: островке патогенности (HP0520-HP0548) и двух зонах пластичности (HP0423-HP0466 и HP0982-HP1028) (рис. 4). Их доля в этих участках колеблется от 15% (штамм 37) до 44% (штамм 33). В отличие от островка патогенности, распределение штаммоспецифических генов в зонах пластичности не имеет закономерного характера. Примечательно, что пластичные зоны содержат гены транспозаз (*PS3IS*, *tnpA*, *tnpB*, *xerD* и *traG*) и ферментов рестрикции-модификации (*hsdR*, *mod*, *hsdS*, *hsdM*, *mfokI*, *hinfIM*, *mboIIR* и *bcgIB*). По-видимому, эти участки можно рассматривать как участки активной рекомбинации, инсерций и транслокаций. Остальная часть штаммоспецифических генов разбросана случайным образом по геному *H. pylori* в виде кластеров, содержащих от 1 до 10 генов.

Расположение штаммоспецифических генов в хромосоме *H. pylori* имеет ряд закономерностей. При сравнении нуклеотидных последовательностей геномов штаммов 26695 и J99 *H. pylori* обнаружено, что одна из инверсий (фрагмент HP974→HP1010 и соответствующая ей инвертированная последовательность HP462←HP428) ассоциирована с областью с более низким содержанием G+C (35%), чем в целом геноме (39%). В штаммах 26695 и J99 этот участок, названный «зоной пластичности», содержит 46% и 48% штаммоспецифических генов, соответственно. Присутствие гомологов *vir* генов и инсерционных элементов также может свидетельствовать о том, что эти участки являются дополнительными островками патогенности (кассета вирулентности) (рис. 5). Как уже отмечалось выше, нами подтверждено, что большинство штаммоспецифических генов действительно локализованы в трех областях (см. рис. 4). По нашему мнению, распределение штаммоспецифических генов по хромосоме указывает на то, что *H. pylori* использует различные механизмы приобретения и удаления генов. Вполне вероятно, что эти гены могли попасть в геном *H. pylori* в результате горизонтального переноса.

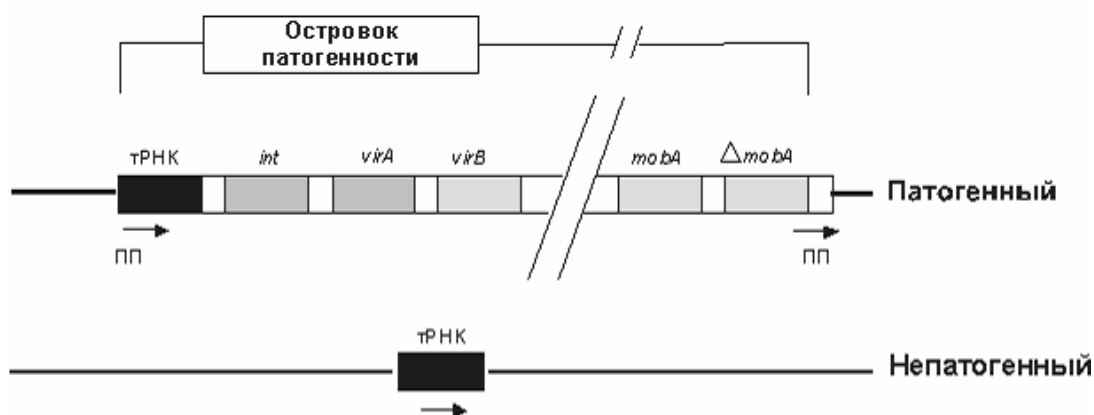


Рис. 5. Схематическое изображение островка патогенности (патогенный и непатогенный штамм).

Жирным выделены консервативные области генома бактерий. Состав островка патогенности: ПП – прямые повторы; *vir* – гены ассоциированные с вирулентностью; *mob* – мобильные элементы; Δmob – псевдомобильные элементы. *mob*-элементы кодируют интегразы, транспозоны, или другие белки, обеспечивающие мобильность генома прокариот.

Полученные нами данные подтверждают концепцию существования вариабельной и постоянной частей генома *H. pylori*. Очевидно, что вариабельная часть генома формируется

благодаря естественной компетентности бактерии, существованию различных механизмов приобретения и элиминации генов, а также внутривидовой рекомбинации.

Разработка классификатора для предсказания горизонтально перенесенных генов в геноме H. pylori. Существенным недостатком исследований по сравнительной геномике различных организмов, проводимых с помощью ДНК-матриц, является использование для их конструирования только известных геномов соответствующих организмов. Другими словами, производится сравнение геномного контента клинического изолята с известным геномом лабораторного штамма бактерии этого же вида. При таком варианте исследований не учитываются уникальные гены, которые могут присутствовать только в клиническом изоляте бактерии. Данное обстоятельство имеет большое значение при изучении таких вариабельных бактерий как *H. pylori*, где макрогетерогенность выражена сильно. Например, ранее было идентифицировано 1495 ОРС в геноме лабораторного штамма *H. pylori* J99 и 1590 ОРС в геноме штамма *H. pylori* 26695, из них только 1408 генов встречаются в обоих штаммах. Количество штаммоспецифических (уникальных, встречающихся только в этом штамме) генов в каждом штамме составило около 100 (7% от всех генов). В настоящее время с помощью ДНК-матриц, сконструированных на основе известных геномов *H. pylori* 26695 и J99, при геномном сканировании клинических изолятов показано, что только 1111 генов формируют функциональное ядро *H. pylori*. Количество штаммоспецифических генов составляет 25% от всех генов в геноме *H. pylori*. Однако при расшифровке генома еще одного штамма *H. pylori* – HPAG1, было идентифицировано 1536 ОРС, а количество уникальных генов составило 91, причем, в HPAG1 отсутствует 29 из 1408 генов, присутствующих в *H. pylori* 26695 и J99. Кроме того, существует вероятность того, что может быть обнаружен еще клинический изолят *H. pylori*, по отношению к которому штаммы 26695 и J99 будут характеризоваться еще большим количеством уникальных генов. Таким образом, ДНК-матрицы позволяют идентифицировать только известные штаммоспецифические гены *H. pylori*, т.е. ограничивают список кандидатных штаммоспецифических генов. Учитывая эти обстоятельства, а также то, что накопление данных по определению минимального функционального ядра *H. pylori* происходит достаточно медленно (к настоящему времени с 2000 г. проведено геномное сканирование только 112 клинических изолятов *H. pylori*), мы поставили перед собой задачу разработать алгоритм предсказания потенциальных штаммоспецифических генов *H. pylori*, возможно обуславливающих вирулентность бактерии.

Данный алгоритм был разработан совместно с С. Сокол (ИНСА/ИНРА, Тулуза, Франция) на основе гауссовской статистики, учитывающей корреляцию между компонентами вектора атрибутов и базирующейся на робастном методе. Алгоритм был разработан с допущением, что штаммоспецифические гены в *H. pylori* являются горизонтально перенесенными (Garcia-Vallve, 2003; Gressmann, 2005). Детально разработанный классификатор описан в диссертации. Суть метода заключается в следующем. Для каждого гена бактерий вычисляется вектор атрибутов, основанный на частотах динуклеотидов. Для этого сначала вычисляется генный вектор o_g , подсчитывающий количество всех динуклеотидов в g гене. Так как существует только четыре типа нуклеотидов {аденин, А; цитозин, С; гуанин, Г; Тимин, Т}, то генный вектор имеет размерность 16. Подсчет ведется в кодирующей части гена в направлении 5'–3'. Важно отметить, что, поскольку динуклеотиды перекрываются, возникает статистическая зависимость векторных компонентов. Генный вектор преобразуется в вектор частот f_g путем деления его компонент на полную сумму и может меняться в интервале [0; 1]. Вектор атрибутов v вычисляется для всех генов каждого из известных бактериальных геномов. Для

данного генома G набор векторов $\{v_g\}$, $g \in G$ может рассматриваться как случайная выборка, размер которой равен количеству генов в геноме G , n_G . Плотность распределения этой выборки моделируется как многомерное Гауссовское распределение $N(\mu_G, \Sigma_G)$ определяемое в 16-мерном пространстве и которое задается средним вектором μ_G и матрицей ковариации Σ_G , которые оцениваются для каждой выборки $\{v_g\}$ робастным способом. Как только Гауссовские параметры оценены для каждого из геномов, проводится сравнение каждого гена из генома тестируемой бактерии с геномами всех бактерий, для этого используется Байесовский классификатор. Он позволяет решить, какой из известных бактериальных геномов является наиболее вероятным источником данного гена в тестируемой бактерии. Байесовский классификатор основан на известной формуле Байеса, связывающей априорно и апостериорно условные вероятности.

Идентификация горизонтально перенесенных генов в *H. pylori*. В результате проведенного анализа с помощью разработанного классификатора было получено, что из 1566 белок-кодирующих генов 979 опознаны как гены из рода *Helicobacter*, причем только 70 из них были распознаны как гены *H. acinonychis* Sheeba (62) и *H. hepaticus* (8). Остальные 909 определялись как гены *H. pylori*. Гены, которые не были распознаны как гены *H. pylori* (non-*H. pylori* genes) распределялись по разным бактериям. Всего таких генов оказалось 587. Среди бактерий, распознавших наибольшее количество генов *H. pylori* как «свои», были представители класса Gammaproteobacteria (21% от всех non-*H. pylori* генов), Clostridia (13%), Bacilli (10%), Mollicutes (9%) и Alphaproteobacteria (8.5%).

Симуляция ложно-отрицательных результатов. Для симуляции ложно-отрицательных результатов в геном *H. pylori* добавляли 100 случайно выбранных генов различной длины из геномов 538 бактерий и оценивали процент ложно-отрицательных результатов. Процедуру повторяли с 200, 300 и 400 случайно выбранными внешними генами. Десять независимых повторов (итераций) использовали в каждом случае. В результате проведенного эксперимента было найдено, что количество ложно-отрицательных результатов составляет, в среднем, 0.4% во всех проведенных экспериментах, причем в 25–40% случаях классификатор правильно определял источник добавленных генов.

Валидация теста. Сравнение с экспериментальными данными. Мы сравнили полученные нами результаты по выявлению функционального ядра *H. pylori* с экспериментальными данными разных групп авторов (Salama, 2000; Gressmann, 2005; Nan, 2007), которые показали, что 1176 генов составляют функциональное ядро *H. pylori*, а варибельная часть состоит из 390 генов (табл. 1). В результате было обнаружено, что данные корреляции неслучайны (χ^2 -test, $p < 0.001$).

Таблица 1. Выявляемость генов *H. pylori* и корреляция разработанного классификатора с экспериментальными данными клинических штаммов *H. pylori* (χ^2 -test)

Эксп. данные\Теоретические	Идентифицированные как <i>H. pylori</i> гены ($n = 979$)	Идентифицированные как не - <i>H. pylori</i> гены ($n = 587$)	P
Основные гены ($n = 1176$)	852	324	< 0.0001
Варибельные гены ($n = 390$)	127	263	

Таким образом, данные по классификации *H. pylori* на «чужеродные» и «свои» гены, полученные с помощью разработанного классификатора достаточно надежно коррелируют с экспериментальными данными. Биологический смысл этой корреляции, вероятно, заключается в том, что большая часть варибельных генов *H. pylori* являются горизонтально

перенесенными генами, на что и указывает классификатор, идентифицируя их как чужеродные. Учитывая, что экспериментально невозможно изучить структурную макрогетерогенность всей популяции *H. pylori*, использование классификатора, по всей видимости, представляет теоретические возможности для поиска функционального ядра *H. pylori*.

Анализ выявленных горизонтально перенесенных генов H. pylori. Проведенный анализ показал, что распределение горизонтально перенесенных (ГП) генов по функциональным группам выглядит неоднородно. Наиболее часто ГП гены, помимо гипотетических генов (309 генов), встречаются в группе генов, кодирующих процессы патогенеза (25 генов), а именно, среди генов островка патогенности *cag* PAI (22 гена из 24), а также *vapD* и *virB4* гены; группе генов, кодирующих процессы хемотаксиса и подвижности (23 гена), большей части (14) генов, кодирующих флагеллярный аппарат *H. pylori*; группе генов, кодирующих внешние белки мембраны (12 генов) и транспорт (16 генов); генов, кодирующих мобильные элементы генома *H. pylori* – 11 генов системы рестрикции-модификации и 13 генов-транспозонов. Таким образом, большинство чужеродных генов, выявленных разработанным классификатором, не связано с кодировкой основных метаболических путей *H. pylori*, а обеспечивают его адаптацию и вирулентность. Интересны результаты использования классификатора в выявлении природы источника происхождения гипотетических генов в геноме *H. pylori*. Выявлено, что 46% от всех гипотетических генов *H. pylori* являются ГП. Важно, что корреляция в этом случае существенна ($\chi^2 = 34.271$, $p < 0.001$).

1.3. Функциональная вариабельность *H. pylori* штаммов

Сравнительный анализ транскрипционных профилей штаммов H. pylori. Сравнение транскрипционных профилей, как правило, используется для характеристики ответа бактерии на какой-либо внешний стимул (тепловой шок, изменение pH среды и т.д.). Данный подход позволяет выделить группы генов (*up*- и *down*-регулируемые), продукты экспрессии которых обеспечивают адаптацию микроорганизма. Нашей целью являлось изучение взаимосвязи геномной гетерогенности *H. pylori* и его транскрипционной активности.

В результате изучения транскрипционных профилей клинических штаммов *H. pylori* было обнаружено, что количество генов, интенсивность сигналов гибридизации (ИСГ) которых на кДНК-макроматрице составляла не менее 0.1% от общей интенсивности, изменялось в пределах от 466 до 572. Количество генов, ИСГ, которых превышала средние значения на кДНК-макроматрице более, чем на 2 SD (стандартное отклонение), также варьировало между клиническими изолятами. Среди этой группы генов одиннадцать генов встречаются во всех клинических изолятах *H. pylori*, в том числе гены HP0601 (*flaA*), HP1243 (*omp28*) и HP0875 (*catA*). Интересно отметить также присутствие в этой группе генов, входящих в один оперон (HP0236-HP0237-HP0238-HP0239-HP0240-HP0241-HP0242-HP0243), и двух генов, кодирующих небольшие пептиды – HP0784 (44 а.к.) и HP1427 (60 а.к.), причем ИСГ первого составляла от 1.5% до 3.8% от суммарной ИСГ на кДНК-макроматрице во всех клинических изолятах.

Далее, был проведен корреляционный анализ между общими (суммарными) транскрипционными профилями клинических штаммов *H. pylori*. Показано, что коэффициент корреляции между *cag*⁻ изолятами составлял 0.83, в то время как между *cag*⁺ изолятами – 0.76. Коэффициент корреляции транскрипционных профилей между *cag*⁻ и *cag*⁺ изолятами составил 0.73. Полученные результаты свидетельствуют о том, что расчет коэффициента корреляции между суммарными транскрипционными профилями клинических штаммов *H. pylori* является малоинформативным и не позволяет выявить каких-либо генотипических особенностей того или иного клинического изолята. Поэтому был проведен сравнительный

анализ транскрипционных профилей групп генов, входящих в определенный функциональный класс. Всего таких классов для *H. pylori* насчитывается 16, а количество групп генов, входящих в них – 66. Нами было выявлено 44 группы генов, в которых коэффициенты корреляции между всеми изолятами *H. pylori* составляли более 0.70. Для 14 групп генов коэффициент корреляции составил более 0.90. Можно предполагать, что столь большое количество высокоррелированных групп (44 из 66) обусловлено тем, что гены, входящие в них, кодируют клеточные и метаболические процессы, которые являются безусловно необходимыми для *H. pylori* (обеспечивают основную жизнедеятельность микроорганизма). Необходимо отметить высокую корреляцию не только групп генов, входящих в определенный функциональный класс, но и некоторых функциональных классов в целом, как синтез белков (синтез белка, 4 группы, 94 гена). Также достаточно много высокоррелированных групп в классе синтеза аминокислот (4 из 5), клеточные процессы (6 из 8) и транспорта и связывания белков (4 из 7). Полное отсутствие корреляции (0–0.10) между транскрипционными профилями было обнаружено для таких групп генов, обеспечивающих вирулентность микроорганизма.

Для выявления группы генов, экспрессия которых значительно различается между клиническими изолятами *H. pylori*, мы применяли метод главных компонент (рис. 6), который используется как метод сокращения данных. Всего выявлено 52 гена, экспрессия которых значительно различается между клиническими изолятами *H. pylori*. В эту группу генов входят гены из разных классов, однако большинство генов отвечают за вирулентность *H. pylori*: цитотоксин-ассоциированный ген (*cagA*), нейтрофил-активирующий белок парА, главный флагеллярный белок (*flaA*), вакуолизирующий цитотоксин (*vacA*), несколько генов, кодирующих внешние мембранные белки (*omp*), некоторые субъединицы уреазы (*ureA* и *ureB*), некоторые регуляторные белки, а также гены, кодирующие белки стресса, такие как шапероны и белки теплового шока, *groEL* и *dnaK*.

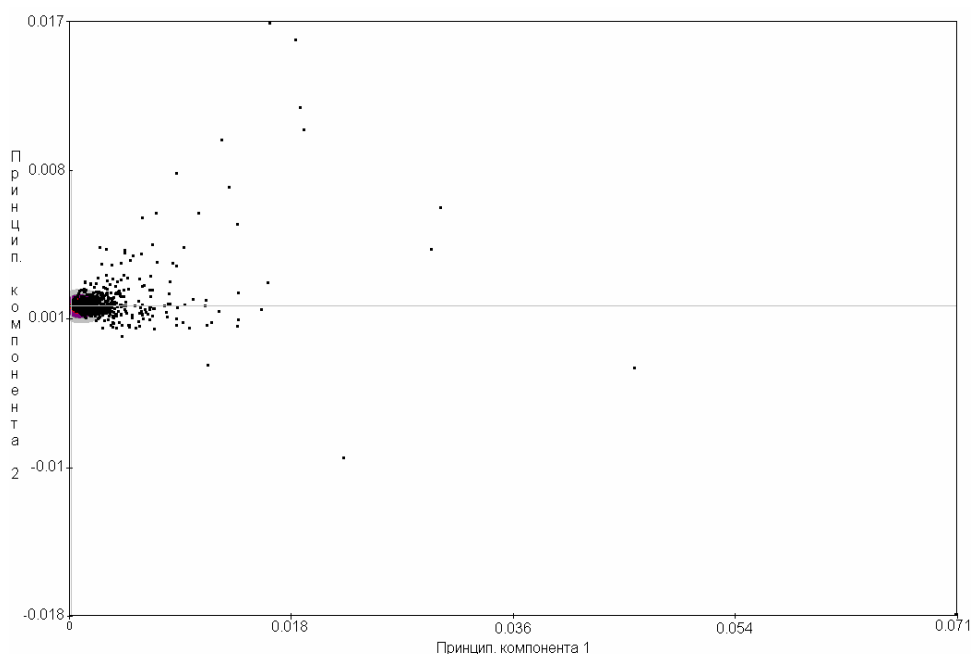


Рис. 6. Диаграмма рассеяния экспрессии генов в клинических изолятах *H. pylori*, полученная с помощью метода главных компонент

Таким образом, помимо того, что каждый клинический изолят *H. pylori* характеризуется уникальным набором генов, в том числе и штамм-специфических, клинические изоляты достоверно отличаются и по уровню экспрессии генов, играющих ключевую роль в вирулентности микроорганизма.

Сравнительная характеристика протеомных карт клинических изолятов H. pylori. Принимая во внимание высокую генетическую вариабельность *H. pylori* штаммов, возникает вопрос, будут ли *H. pylori* штаммы функционально гетерогенны или же нет. Нами (совместно с протеомным центром ИБМХ РАМН) с использованием двухмерного гель-электрофореза и MALDI-TOF масс-спектрометрии были получены протеомные карты 10 клинических штаммов *H. pylori* и штамма J99. Полученные электрофореграммы по архитектонике интенсивных пятен, относящихся к мажорным белкам с наибольшим уровнем экспрессии (субъединицы уреазы UreB и UreA, алкилгидропероксидредуктаза TsaA, тиоредоксин и др.), соответствовали протеомным картам, полученным ранее Jungblut и коллегами (2000) и сравнивались с протеомной картой штамма J99, полученной в аналогичных условиях.

Таблица 2. Идентифицированные отличия протеомных карт десяти клинических штаммов *H. pylori*

Название белка	Клинические штаммы									
	36	37	19	8	6	50	52	53	57	58
Белок островка патогенности Cag26	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
АТФ-зависимая связывающая протеазу субъединица (ClpB)	→	→ ↓	→ ↓	→ ↓	=	→	→	=	=	→
60-кДа шаперон (GroEL)	=	=	→	=	→	= ↓	=	=	=	→
Триггер-фактор (Tig)	→	→	→	=	←	=	→	←	=	→
Предшественник белка секреции гемолизина (HylB)	→	→	→	→	=	=	=	=	→	=
Предполагаемый регулятор транскрипции	↓	=	↓	↓	↑	↓	↓	↓	=	↓
Гипотетический белок	=	=	=	=	-	=	↑	=	=	=
Супероксиддисмутаза (SodF)	=	=	=	←	=	→	=	=	→	=
NADPH-флавиноксидоредуктаза (FrxA)	–	–	+	–	+	–	–	+	+	–
Предшественник пептидогликан-ассоциированного липопротеина (PAL; Omp18)	←	←	=	=	=	=	=	=	=	=
Адгезин-тиолпероксидаза (TagD)	=	=	↓; ←	↓; ←	↓	↓	↓; ←	↓; ←	↓; ←	↓; ←
Негемовый ферритин (Pfr)	↓	=	↑	=	↓	=	=	↑	↑	↑

Примечание. Сдвиги по изоэлектрической точке приведены относительно штамма J99. → – выраженный сдвиг в щелочную область, ← – выраженный сдвиг в кислую область; (+) или (–) – наличие или отсутствие соответствующего белкового пятна; (↓) или (↑) – снижение или увеличение экспрессии белка; (=) – приблизительное сходство по отношению к выбранному штамму сравнения

2. Микро- и макровариабельность *H. pylori* как следствие адаптации бактерии к окружающему стрессу

2.1. Функциональная вариабельность *H. pylori* при раннем раке желудка

Обоснование модели. Многочисленными исследованиями, в том числе и проведенными нами, показано, что *H. pylori* характеризуется не только структурной, но и функциональной вариабельностью, однако причины и условия возникновения вариабельности *H. pylori* до настоящего момента не понятны. Можно предположить, что единичный клон *H. pylori* быстро дивергирует внутри желудка инфицированного индивида, адаптируясь к новым условиям окружающей среды, и после того как ниша занята, скорость изменений резко падает. Учитывая, что заражение человека *H. pylori* происходит в детском возрасте, проследить динамику изменений микроорганизма в период быстрой дивергенции не представляется возможным. Попытки обнаружить генетические изменения в *H. pylori* при инфицировании взрослых волонтеров лабораторным штаммом *H. pylori* не увенчались успехом (Salama et al, 2007). Альтернативная гипотеза заключается в том, что заражение является поликлональным, т.е. в организме хозяина в момент инфицирования присутствуют несколько различных популяций *H. pylori*, и конечный клональный вариант *H. pylori* является результатом дивергенции популяции в ходе нескольких делений в организме человека.

До настоящего времени вариабельность *H. pylori* оценивали при сравнении двух *H. pylori* штаммов, выделенных от одного пациента через определенные промежутки времени. При таком дизайне исследования всегда существует вероятность, что в период (который обычно составляет не менее 6 месяцев) между выделениями желудка пациента был дополнительно колонизирован еще одним новым изолятом *H. pylori*. Тогда наблюдаемые изменения в последовательно выделенных парах *H. pylori* изолятах могут являться следствием рекомбинации ДНК двух штаммов *H. pylori* – исходного и нового, а не результатом естественной дивергенции бактерии. Для исключения этой возможности мы исследовали динамику генетических и фенотипических изменений *H. pylori*, выделенных из разных участков слизистой оболочки желудка от пациента с ранним раком желудка. Данная модель позволила нам сравнить *H. pylori*, адаптирующегося (не адаптированного) к новым условиям, появившихся в результате дисплазии (ранний рак) слизистой оболочки желудка, с этим же штаммом *H. pylori*, но выделенным из неизмененных отделов этого же желудка. Другими словами, в одном из участков слизистой оболочки желудка, откуда непосредственно выделяли *H. pylori*, локализовалась опухоль, расположенная в пределах слизистого и подслизистого слоев стенки желудка и не превышающая 2 см (новые условия), в то время как другие участки желудка, откуда также выделяли *H. pylori*, морфологически изменены не были (старые условия). В качестве контроля мы также исследовали *H. pylori* из разных отделов желудка от больного, страдающего хроническим гастритом (условия неизменны по всем отделам).

Дифференциальная экспрессия белков HrpP и HrpX. С каждой биопсии, взятых из свода, тела и антрального отдела желудка, получали по пять колоний. Для установления идентичности *H. pylori* штаммов, выделенных из одного желудка, использовали метод мультилокусного типирования. В результате секвенирования генов домашнего хозяйства *atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI* и *uhpC* было показано, что *H. pylori*, выделенные из одной и той же биопсии абсолютно идентичны. В связи с этим для дальнейшей работы было отобрано по три клон для каждого выделенного штамма *H. pylori*.

Для идентификации дифференциально экспрессирующихся белков в изолятах *H. pylori* был использован двухмерный электрофорез с дифференциальным окрашиванием образцов Cy3/Cy5 CyDye™ DIGE Fluors (Amersham/GE Healthcare). Белки экстрагировали из трех клонов каждого из шести штаммов для исключения небиологической вариации (рис. 7). Содержание индивидуального белка в сравниваемой паре считали измененной значительно, если интенсивность флуоресценции различалась более чем в два раза. При анализе штаммов, выделенных от пациента с хроническим гастритом (НрХГ), было обнаружено 14 пятен, отличающихся по интенсивности более чем в два раза от аналогичных пятен штаммов *H. pylori* из разных отделов желудка, из которых было идентифицировано 12 пятен. При анализе штаммов, выделенных от пациента с ранним раком желудка (НрРР), было выявлено 32 пятна, отличающихся по интенсивности, из которых было идентифицировано 18 пятен. Всего во всех изолятах *H. pylori* были идентифицированы 28 переменных белков.

Белки Idh, FrdB, MetX, SodB и Cad были идентифицированы только в НрРР изолятах. FlaA был обнаружен только в изолятах НрХГ. Для того, чтобы проверить не связаны ли данные различия со сдвигом по *pI* вследствие значительного аминокислотного полиморфизма белков, была определена нуклеотидная последовательность четырех генов *icd*, *sod*, *cad* и *tsaA* во всех изолятах. Все четыре гена оказались идентичными как в НрРР, так и в НрХГ изолятах. При сравнении аминокислотной последовательности Icd, Sod, Cad и TsaA между изолятами НрРР и НрХГ было выявлено, что белки Icd и TsaA отличаются только одной аминокислотной заменой, не приводящей к изменению заряда и, следовательно, их отсутствие в соответствующей позиции на 2DE-карте в НрХГ изолятах не связано с аминокислотным полиморфизмом. Аминокислотные замены в Sod и Cad приводят к изменению заряда, и вероятно, с этим может быть связано их отсутствие в соответствующей позиции на 2DE НрРР, так и в НрХГ карте НрХГ штаммов в сравнении с НрРР изолятами.

Для оценки экспрессии белков *H. pylori* в разных отделах желудка при гастрите и раннем раке интенсивность сигналов белков оценивали (нормализовали) по отношению к интенсивности сигналов соответствующих белков *H. pylori*, выделенного из антрального отдела. В результате для НрХГ штаммов было найдено, что в семи случаях из 13 экспрессия белков увеличивается в изолятах, выделенных из тела и свода желудка. При анализе НрРР штаммов наблюдалась иная картина. Найдено только два белка из 18, экспрессия которых изменялась одновременно в изолятах, выделенных из тела и свода желудка. Кроме того, в отличие от НрХГ штаммов, основное количество гиперэкспрессируемых белков (12 из 18) присутствует только в изоляте, выделенном из свода желудка.

Оценка структурной гетерогенности *H. pylori* штаммов с помощью ДНК-макроматриц показала, что НрРР изоляты содержат *sa*g PAI – основную детерминанту вирулентности *H. pylori*, а штаммы, потерявшие этот островок, являются скорее комменсалами, чем патогенами. Более примечательно, что в НрРР изолятах были обнаружены все гены *sa*g PAI, так как присутствие полного набора генов, формирующих этот островок, в пять раз увеличивает тяжесть заболевания, чем неполный PAI. Идентифицирован набор генов, которые встречаются только в НрРР изолятах, среди которых необходимо выделить гены аденин-специфические ДНК метилтрансфераз (HP0260 и HP0481). Однако представляется маловероятным, что структурная гетерогенность *H. pylori* определяет процессы адаптации *H. pylori* к локально измененной среде желудка при раннем раке.

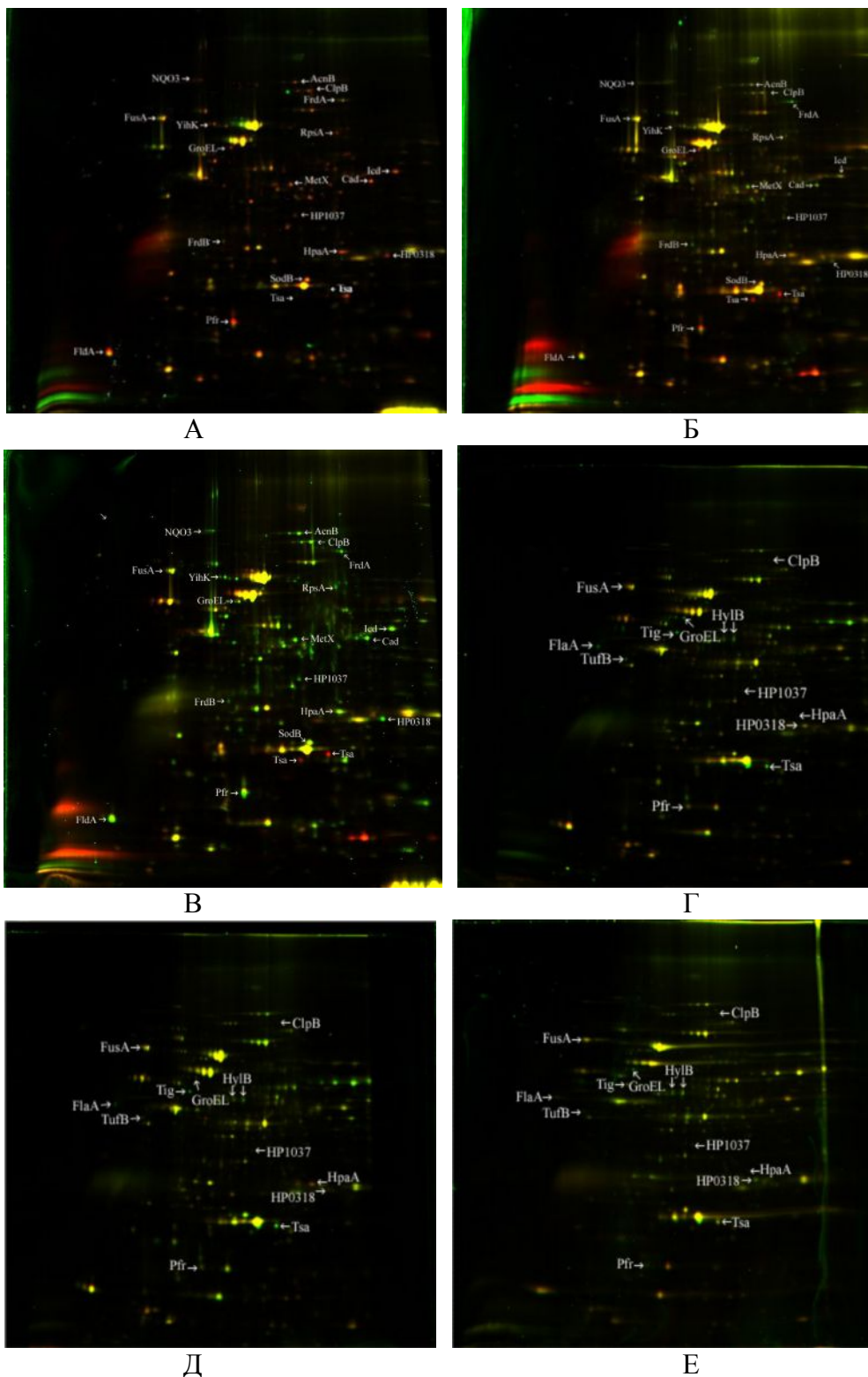


Рис. 7. Дифференциальный экспрессионный анализ *H. pylori* выделенных из разных отделов желудка при раннем раке (А,Б,В) и хроническом гастрите (Г,Д,Е).

А – *H. pylori*, выделенный из свода (Cy5) и антрального отдела (Cy3) желудка; Б – *H. pylori* из тела (Cy5) и антрального отдела (Cy3) желудка; В – *H. pylori* из тела (Cy5) и свода (Cy3) желудка, Г – *H. pylori* из свода (Cy3) и антрального отдела (Cy5) желудка; Д – *H. pylori* из тела (Cy3) и антрального отдела (Cy5) желудка и Е – *H. pylori* из тела (Cy5) и свода (Cy3) желудка.

Анализ функциональной гетерогенности H. pylori при раннем раке желудка. Для решения поставленных задач необходимо было выяснить: 1) как изменяется экспрессионный профиль *H. pylori* штаммов внутри одного желудка при отсутствии генетической гетерогенности штаммов и 2) идентифицировать белки, экспрессия которых достоверно различается между НрХГ и НрРР. В результате проведенного анализа было обнаружено, что при раннем раке желудка количество белков, экспрессия которых различается в *H. pylori* изолятах (32 пятна) в пределах одного желудка, превышает количество аналогичных белков в *H. pylori* при гастрите (14 пятен). Вполне вероятно, что степень функциональной гетерогенности *H. pylori* штаммов характеризует состояние слизистой желудка. Об этом свидетельствуют данные корреляционного анализа экспрессионных профилей *H. pylori*, составленные из сигналов интенсивностей идентифицированных белков. При гастрите все *H. pylori* изоляты имеют достаточно близкий профиль (коэффициент корреляции Пирсона $0.90 < r < 0.96$), тогда как изоляты НрРР имеют более разнообразный экспрессионный профиль ($0.77 < r < 0.85$). Следует отметить, что функциональная гетерогенность *H. pylori* штаммов в обоих случаях обнаружена на фоне структурной (нуклеотидной) идентичности штаммов в пределах одного желудка. Вероятно, что необходимо разграничить два процесса: 1) адаптацию микроорганизма к морфологически разным по строению отделам желудка – антрум, тело и свод; и 2) адаптацию микроорганизма к патологическим процессам (неопластический процесс vs хроническое воспаление), протекающих на слизистой желудка. Как известно, свод и тело желудка анатомически похожи друг на друга и формируют фундальный отдел желудка, в котором находятся главные клетки, выделяющие желудочный сок с пепсином, и обкладочные клетки, непосредственно продуцирующие H^+ и СГ. В антральном отделе обкладочных клеток нет и находятся гастрин-продуцирующие пилорические железы. рН антрального отдела выше, чем в фундальном отделе желудка. Для проверки зависимости экспрессионных профилей от анатомического строения желудка, мы сравнили экспрессионные профили всех *H. pylori* штаммов, составленные из белков, встречающихся во всех изолятах. В результате проведенного анализа было обнаружено, что корреляция экспрессионных профилей между *H. pylori* изолятами, выделенными из свода и тела желудка, как при раннем раке желудка ($r = 0.89$), так и при гастрите (0.99) несколько выше, чем корреляция экспрессионных профилей штаммов из антрального отдела с изолятами из тела (0.85) и свода желудка (0.90). С другой стороны, экспрессионный профиль НрРР изолята, выделенного из антрального отдела оказался даже более схож с соответствующим НрХГ изолятом ($r = 0.89$), чем с НрРР изолятами выделенными из тела и свода желудка ($r < 0.79$). На наш взгляд, эти данные свидетельствуют о том, что анатомические особенности желудка в некоторой степени предопределяют фенотипическую вариабельность *H. pylori*.

Среди белков идентифицированных нами как дифференциально экспрессирующиеся *H. pylori* как внутри желудка, так и при двух разных патологических состояниях желудка, основную часть составляют белки-антиоксиданты (SodB, KatA, AphC/TsaA, TrxA, Pfr), белки цикла трикарбоновых кислот (Idh, FrdA, FrdB, FldA AcnB) и белки теплового стресса (GroEL и ClpB). Вариации белков-антиоксидантов SodB, KatA, AphC/TsaA, TrxA, Pfr в *H. pylori* свидетельствуют о вовлечении активных форм кислорода (АФК) в воспаление, вызываемое микроорганизмом. АФК генерируются в большом количестве фагоцитами, в основном, нейтрофилами и макрофагами, которые инфильтрируют субэпителиальный слой gastric lamina propria при гастрите. Экспрессия онкогенов и клеточная пролиферация также влияет на концентрацию АФК. *H. pylori* стимулирует гиперпролиферацию клеток желудка, которая является необходимым этапом в развитии аденокарциномы.

В данном исследовании, проведенном совместно с Иванисенко В.А. и Аман Е.Э. (ИЦИГ СО РАН, Новосибирск), были предприняты попытки реконструкции молекулярно-генетических взаимодействий дифференциально экспрессирующихся белков *H. pylori* при гастрите и раннем раке желудка. Работа проводилась с использованием компьютерной системы AND (Associative Network Discovery), которая включает в себя базу данных ANDCell, содержащую более 5 млн. фактов о молекулярно-генетических взаимодействиях, химических ферментативных реакциях, фактах о генетической регуляции, автоматически экстрагированных из текстов рефератов PubMed и молекулярно-генетических баз данных, а также программу ANDVisio, обеспечивающую доступ к базе данных и представление результатов поиска в виде ассоциативных семантических сетей (рис. 8).

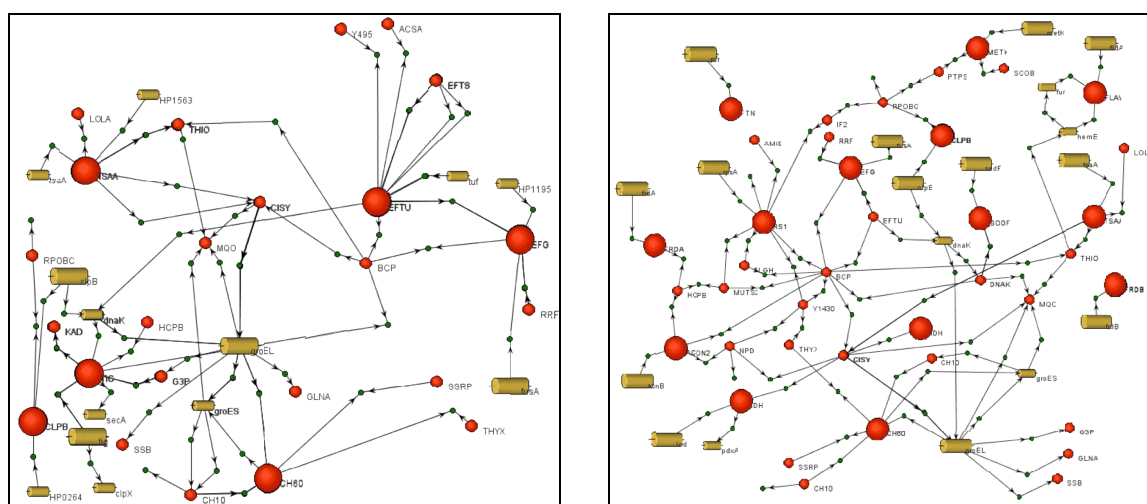


Рис. 8. Ассоциативная сеть генов *H. pylori*, экспрессия которых изменяется при гастрите (слева) и раннем раке желудка (справа).

Условные обозначения: - ген, - белок, - ассоциация.

Обнаружено, что центральное ядро сети генов *H. pylori*, экспрессия которых изменяется при гастрите, составляет группа молекулярных шаперонов (*groES*, *groEL*, *dnaK*, *TiG*, *clpB*). Отдельный узел сети составляют белки, связанные с тиоредоксинредуктазой (*TsaA*) и тиоредоксином (*ThiO*). Этот кластер связан с ядром шапероновых белков через ферменты малатдегидрогеназу и цитратсинтазу. Известно, что GroEL и GroES связываются с этими ферментами и предотвращают их инактивацию под действием температуры. Также имеются данные, что тиоредоксинредуктаза и тиоредоксин обладают шаперонной активностью, способствуя формированию функциональной укладки цитратсинтазы. Тиоредоксин также способен образовывать слабые связи с малатдегидрогеназой. Таким образом, кластер тиоредоксина, скорее всего, является частью функционального ядра, образованного белками-шаперонами. Еще один кластер сети образуют белки и гены факторы элонгации (Ef-Tu, Ef-G, Ef-Ts, EF-2 (HP1195)). Фактор элонгации Ef-Tu также обладает шаперонной активностью по отношению к ряду белков. Возможно, другие факторы элонгации также способны проявлять такую активность.

Подсеть, объединяющая белки флагеллин А (*FlaA*), флагеллярный адгезин (*HpaA*) и шаперон *ClpB*, включает такие компоненты как *CagA* (cytotoxina associated gene), *FeoB*, участвующий в транспорте ионов железа, *UvrA* – компонент UvrABC системы, отвечающий за репарацию ДНК, *RpoBC* – ДНК-зависимую РНК полимеразу и *Rpl15* – 50S рибосомальный белок и цитотоксин *VacA*. Эти белки связаны между собой физическими взаимодействиями,

чья функциональная значимость до сих пор не была выявлена и является предметом для дальнейшего исследования.

Ассоциативная сеть генов *H. pylori*, экспрессия которых изменяется при раннем раке желудка, содержит большинство белков, генов и связей сети гастрита, однако в ней присутствует ряд новых объектов, прежде всего ферментов, таких как фумаратредуктаза (FfdA), аконитаза (AcoN2), изоцитрадегидратаза (Idh), супероксиддисмутаза (SodF) и метионинаденозилтрансфераза (MetK). Большинство взаимодействий, объединяющих эти ферменты с основным ядром, содержащим шапероновые белки, выявлено с помощью двухгибридной системы, но их функциональная значимость пока не выяснена. Таким образом, сеть взаимодействий генов и белков, экспрессия которых изменяется при раннем раке желудка, включает, с одной стороны, ряд шаперонов, как и в случае с гастритом, а с другой стороны, содержит ферменты, участвующие в цикле трикарбоновых кислот, антиоксидантной защите и метаболизме аминокислот. Вероятно, что изменение экспрессии этих белков обусловлено непосредственной модуляцией жизнедеятельности патогена раковыми клетками, которые характеризуются повышенным метаболизмом по отношению к нормальным клеткам. Например, раковые клетки поглощают из среды в 10–30 раз больше глюкозы, чем нормальные, т.е. *H. pylori*, находясь в непосредственной близости от раковых клеток, испытывает с одной стороны недостаток глюкозы, а с другой, в среде присутствует избыточное количество ди- и трикарбоновых кислот, образующихся в качестве промежуточных продуктов при распаде и синтезе белков, жиров и углеводов в трансформированной ткани. Вероятно, что изменение экспрессии части ферментов (FrdA, FrdB, Icd, FldA, AcsB), участвующих в цикле трикарбоновых кислот в *H. pylori* при раке желудка, обусловлено этими процессами. С другой стороны, накопление токсических продуктов в среде при раннем раке желудка может являться причиной изменения экспрессии CadA, который катализирует дисмутацию бензальдегида и снижает концентрацию альдегидов в клетке.

Таким образом, в пределах одного желудка экспрессия белков *H. pylori* может различаться более чем в два раза, причем, изменение происходит на фоне неизменной структуры генома штаммов. Экспрессионные профили штаммов, выделенных из разных отделов одного желудка, более схожи между собой, чем экспрессионные профили штаммов, выделенных из разных желудков. Основную часть вариабельных белков *H. pylori* составляют белки-антиоксиданты, белки цикла трикарбоновых кислот и белки теплового стресса.

2.2. Генерация микроварибельности при адаптации *H. pylori* к антибиотик

Исследованы геномные события, происходящие в геноме *H. pylori* при его адаптации к рифампицину в качестве стрессового фактора. Рифампицин – антибиотик, который ингибирует РНК-полимеразу прокариот на этапе инициации транскрипции. Генетическая резистентность к рифампицину обусловлена точечными мутациями в *rpoB* гене, в результате которых фермент сохраняет свои свойства, но теряет способность связываться с антибиотиком. Данное исследование стало возможным благодаря развитию геномных технологий, позволяющих быстро и недорого ресеквенировать целые геномы микроорганизмов. Секвенирование целых геномов позволяет раскрыть новые механизмы адаптации бактерий к различным агентам, в том числе и антибиотикам.

Сравнительный анализ геномов H. pylori. Для оценки влияния рифампицина на возникновение мутаций в геноме *H. pylori* в качестве контроля был использован штамм 26695, долгое время культивировавшийся на искусственных средах (далее обозначен как 26695m) и два РИФ^Р штамма P1 и P2, полученные в результате селекции *H. pylori* 26695m *in vitro* на агаре в присутствии 20 мкг/мл рифампицина. Предварительная нуклеотидная

последовательность геномов *H. pylori* 26695m и РИФ^Р штаммов P1 и P2 была определена компанией 454 Life Sciences. При сравнительном анализе геномных последовательностей 26695m, P1, P2 и *H. pylori* 26695 (NC000915) в трех штаммах была выявлена 131 мутация. Однако при секвенировании ПЦР продуктов, полученных с праймеров, фланкирующих участки генов, содержащих соответствующие мутации, было подтверждено только 80 мутаций. Среди них 20 мутаций являются общими для всех штаммов, пять идентичных мутаций обнаружено в обоих РИФ^Р штаммах, шесть уникальных мутаций найдено в P1 и 4 в P2 штаммах (Рис. 9).

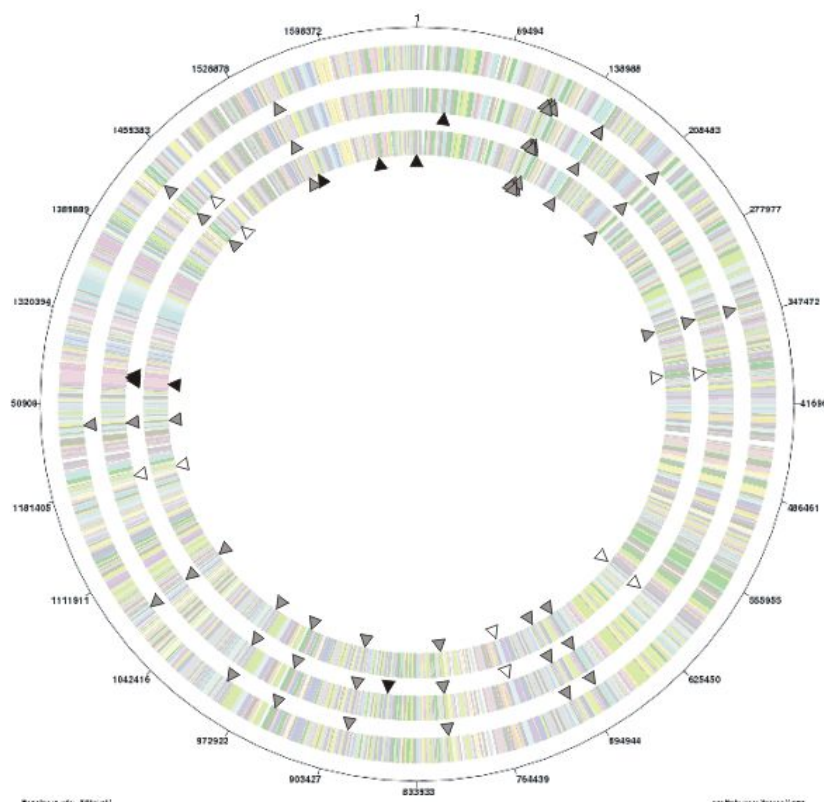


Рис. 9. Распределение мутаций в геномах *H. pylori* 26695 и РИФ^Р штаммах P1 и P2.

Внешнее кольцо – виртуальная хромосома 26695m, среднее кольцо – P1 и внутреннее кольцо – P2. Серые треугольники – общие мутации, белые тр-ки – мутации общие для P1 и P2 штаммов и черные тр-ки – уникальные мутации.

Сравнительный анализ мутаций в рифампицинустойчивых штаммах H. pylori. В двух РИФ^Р штаммах P1 и P2 было обнаружено 11 и 9 мутаций (включая мутации в *rpoB* гене), соответственно, причем пять мутаций (T389863C, Ins597760T, G748722T, T189153G, Del1487684GA, указаны положение и замены мутаций в геноме бактерий) являются общими. Мутации обусловлены как инсерцией/делецией нуклеотидов, так и нуклеотидными заменами. Все мутации, за исключением мутации T389863C в гене *HP0379* и T1189153G в гене *HP1123* в обоих штаммах являются критическими. Мутации *ins597760T* в *HP0565* (общая для P1 и P2) и *del872293A* в *proV* в P1 вызывают сдвиг рамки считывания и приводят к преждевременной терминации трансляции. Мутация G748722T в гене N-methylhydantoinase приводит к образованию стоп-кодона (gAG-tAG) в обоих РИФ^Р штаммах. Остальные мутации являются несинонимичными. Инсерция *ins1570087ACT* – целого кодона – в *HP1497*

приводит к вставке аминокислоты Thr. Интересно, что в результате мутации del1487684GA в гене *HP1417*, который имел аутентичный сдвиг рамки считывания, структура гена восстанавливается.

Если в P2 штамме была найдена только одна мутация – H540Y (G1275432A) в *rpoB* гене, – то в P1 штамме в *rpoB* гене было обнаружено три мутации – T588I (G1275287A), D530N (C1275462T) и S155I (C1276586A), причем мутация S155I (C1276586A) не относится к мутациям, обуславливающим устойчивость к рифампицину. Мутация T588I в P1 штамме, по-видимому, компенсирует фитнес, связанный с РИФ^Р генотипом D530N.

Учитывая, что мутации в HP0379 (fucosyltransferase) – T389863C, HP0565 – Ins597760T, Hp0696 (N-methylhydantoinase) – G748722T, slyD (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type rotamase) – T1189154G, и HP1417 (Del1487684GA) оказались общими для двух мутантных штаммов, было проверено являются ли эти мутации случайными. С этой целью мы попытались выявить все найденные мутации в других РИФ^Р штаммах (P3–P9), полученных в этом же эксперименте. Помимо мутаций в *rpoB* гене во всех штаммах, часть из которых, по-видимому, являются компенсаторными, в 4 штаммах *H. pylori*, были обнаружены 4 нуклеотидные замены T389863C, Ins597760T, G748722T, Del1487684GA. В остальных трех штаммах указанные выше мутации были обнаружены частично: в одном выявлены мутации T389863C, Ins597760T, Del1487684GA, во втором – Ins597760T, G748722T, Del1487684GA мутации и в третьем – Ins597760T, Del1487684GA

Скрининг общих мутаций в H. pylori, возникающих при адаптации к субмикровым концентрациям рифампицина. Ранее было показано, что в зависимости от концентрации антибиотика инактивируются различные гены *H. pylori*. Например, при низких концентрациях метронидазола (32 мкг/мл) инактивируются *rdxA* и *frxA* нитроредуктазные (nitroreductase) гены, а при высоких концентрациях дополнительно инактивируются *ribF* (riboflavin kinase/FMN adenyltransferase), *mdaB* (quinone reductase), *omp11* и *fur* (Ferric uptake regulation protein) гены.

Для проверки предположения, что мутации, найденные во всех выделенных РИФ^Р клонах, являются отражением адаптации *H. pylori* к рифампицину был поставлен следующий эксперимент. *H. pylori* инкубировали с различными субингибиторными концентрациями (МИК *H. pylori* - 1 мкг) рифампицина: 0.2 мкг/мл, 0.4 мкг/мл и 0.8 мкг/мл в течение 48 ч, затем выделяли тотальную геномную ДНК и проводили амплификацию фрагментов, включающих 389863, 597760, 748722, 189153 и 1487684 позиции. Полученные фрагменты клонировали, для каждого фрагмента было получено по ~1200 рекомбинантных клонов, из них для секвенирования было отобрано 96 случайных клонов. В результате проведенного эксперимента нам не удалось обнаружить мутаций T389863C, Ins597760T, G748722T, T189153G, Del1487684GA в *H. pylori* при субмикровых концентрациях рифампицина. Следовательно, можно предположить, что наличие данных мутаций в РИФ^Р мутантах не является необходимым условием, обеспечивающим устойчивый фенотип *H. pylori* к рифампицину. Другими словами, при адаптации *H. pylori* к рифампицину происходит накопление мутаций не ассоциированных с устойчивостью к антибиотику, и вероятно, являются следствием адаптации бактерии к окружающему стрессу. На следующих этапах работы, мы попытались выявить возможные механизмы генерации генетической variability *H. pylori*.

2.3. Метилирование ДНК как один из возможных механизмов изменчивости *H. pylori*

Соответствие нуклеотидов между белок-кодирующими последовательностями штаммов H. pylori 26695 и J99. Предполагается, что геномная гетерогенность *H. pylori* обусловлена высокой частотой межштаммовых и внутригеномных рекомбинационных событий (Suerbaum, 1998). Вместе с тем необходимо отметить, что рекомбинация не приводит к образованию новых полиморфных сайтов, но увеличивает количество уникальных последовательностей при уже существующем полиморфизме нуклеотидов. Очевидно, что наряду с рекомбинациями, мутации *de novo* играют значительную роль в формировании генетической гетерогенности *H. pylori*. Механизмы, обуславливающие повышенную частоту мутаций в геноме хеликобактера, слабо изучены. Вместе с тем известно, что дезаминирование цитозина, скорость которого составляет по некоторым оценкам $3-7 \times 10^{-13} \text{ с}^{-1}$ в двухспиральной ДНК, является одним из важнейших источников мутаций у разных организмов. Скорость дезаминирования в случае одонитевой ДНК увеличивается в 140 раз. В результате «спонтанного» гидролитического дезаминирования цитозина образуется урацил, спаривание которого с аденином во время репликации приводит к С→Т транзиции. Несмотря на то, что данный процесс нивелируется ферментом урацил-ДНК-гликозилазой (UDG), замены С→Т являются доминирующими в спектре спонтанных нуклеотидных замен у бактерий и эукариот. Кроме этого, показано, что скорость дезаминирования цитозина возрастает в 2–4 раза при его предварительном метилировании в 5-ом положении. При анализе геномов *H. pylori* следует принять во внимание, что некоторые клинические изоляты и лабораторные штаммы этого микроорганизма содержат свыше 20 систем рестрикции-модификации II типа, в состав которых, как правило, входят одна или две метилтрансферазы. При этом систем репарации нуклеотидных ошибок в опубликованных геномах *H. pylori* не аннотировано. Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что геном *H. pylori* является уникальным субстратом для химической модификации, обусловленной процессами метилирования-дезаминирования, результатами которых должна быть высокая частота С→Т транзиций по сравнению с другими нуклеотидными заменами. Для изучения асимметрии нуклеотидных вариаций в *H. pylori* мы исследовали соответствие нуклеотидов между соответствующими ОРС двух штаммов *H. pylori* 26695 и J99.

Соответствие нуклеотидов между ОРС H. pylori 26695 и J99. Генетическая гетерогенность *H. pylori* обусловлена не только точечными мутациями, но и процессами рекомбинации. Вероятно, что если две сравниваемые ОРС *H. pylori* отличаются между собой по длине, то вклад процессов рекомбинации, выражающийся во вставке или делеции нуклеотидов в генах, достоверно исключить нельзя. То есть наблюдаемый полиморфизм в гомологичных генах разной длины в большей степени связан с процессами рекомбинации в *H. pylori*. Так как целью нашей работы являлось выявление нуклеотидных несоответствий, обусловленных только точечными мутациями, то данные гены исключали из анализа. При сравнении ОРС *H. pylori* 26695 и J99 выявлено всего 941 одинаковых по длине гомологичных ОРС из 1372.

Первоначально проанализированы частоты соответствий мононуклеотидов по положению в выровненных ОРС обоих штаммов *H. pylori*. Выявлено, что в спектре нуклеотидных соответствий преобладают соответствия по типу транзиций (более 3%) над трансверсиями (менее 1%). Преобладание соответствий по типу транзиций обусловлено процессами дезаминирования цитозина в кодирующей цепи ДНК (С→Т (5.3%) и Т→С (3.5%)) и некодирующей (А→Г (2.9%) и Г→А (3.9%)). Доля соответствий по типу трансверсий (А→С, А→Т, С→А, С→Г, Г→С, Г→Т, Т→А и Т→Г) не превышала 0.84%.

Статистическая значимость обнаруженных различий частот соответствий $p < 0.01$ (t-критерий, в качестве исходных данных использовали множества, элементами (941) которых являлись частоты замен нуклеотидов в паре генов). Интересно, что в кодирующих последовательностях замены С→Т более часты, чем аналогичные замены на некодирующей цепи. Наблюдаемая асимметрия может быть обусловлена неодинаковой скоростью мутаций связанной с процессами транскрипции (transcription-associated mutational pressure). Далее мы проанализировали соответствие нуклеотидов в двух выровненных геномных последовательностях *H. pylori* 26695 и J99, в зависимости от положения нуклеотида в кодоне. В результате обнаружено, что наибольшим вариациям подвержен нуклеотид, находящийся в третьей позиции нуклеотидного триплета. Наиболее часто встречающиеся нуклеотидные соответствия во всех положениях в кодоне: С→Т, Т→С, А→Г и Г→А (от 1.9% для А→Г во втором положении, до 19.5% для С→Т в третьем). Преобладание транзиций (А→Г, Т→С, Г→А и С→Т) над трансверсиями (А→С, А→Т, С→А, С→Г, Г→С, Г→Т, Т→А и Т→Г) может быть обусловлено синонимичностью или несинонимичностью нуклеотидной замены, однако из представленных данных видно, что в *H. pylori* транзиции преобладают над трансверсиями также в первой и второй позиции нуклеотида в кодоне, причем доля транзиций превосходит долю трансверсий в несколько раз. Таким образом, можно констатировать, что доминирование транзиций С:Г→Т:А в спектре нуклеотидных соответствий преимущественно обусловлено высокой скоростью перехода С→Т в белок-кодирующих нуклеотидных последовательностях *H. pylori*.

Соответствие нуклеотидов в тетрануклеотидах ОРС H. pylori 26695 и J99. Изучение вклада процессов метилирования в транзициях С→Т, оценивая с учетом возможных замен по типу С:Г→Т:А в сайтах метилирования в геномах штаммов *H. pylori* 26695 и J99, проводили с помощью предложенного нами метода анализа соответствий тех или иных нуклеотидных мотивов в идентичных геномных последовательностях двух штаммов *H. pylori*. Для анализа были взяты тетрануклеотидные мотивы G^mCGC и A^mCGT , сайты модификации метилтрансфераз, обладающих 5mC-активностью. Наиболее значительная доля соответствий между С и Т была найдена для мотива ACGT-ATGT (28.3%) по положению, в то же время соответствие между Г и А в составе этого же тетрануклеотида ACGT-ACAT также значимо (6.9%). Соответствие между нуклеотидом С в составе GCGC мотивов и Т в составе GTGC составило 6.6%, а между Г в GCGC и А в GCAG – 4.9%. Интересно, что соответствие между неметилованным С в GCGC и Т в GCGT составило 3.3%. Уровень достоверности полученных различий $p < 0.01$ (t-критерий). Полученные результаты, а именно значительную долю соответствий между С и Т в составе ACGT-ATGT (28.3%) по сравнению с GCGC-GTGC (6.6%), можно объяснить различной функциональной активностью 5mC-метилтрансфераз в двух штаммах *H. pylori*. Только одна метилтрансфераза, обладающая 5mC-активностью, HP1121 (G^mCGC), обнаружена в *H. pylori* 26695. В штамме J99 обнаружены две активные 5mC-метилтрансферазы: JHP1050 (G^mCGC) и JHP435 (A^mCGT).

Возможно, что присутствие активных метилаз одного типа в обоих штаммах *H. pylori* делает равновероятным процесс мутирования нуклеотидов в одних и тех же выровненных сайтах метилирования, где эти мутации не являются летальными. Вследствие этого профили мутаций в обоих штаммах *H. pylori* будут достаточно близки. Следует отметить, что если замена С→Т произошла в одной и той же позиции гена обоих штаммов, данная замена не будет распознана предложенным методом, поскольку нет исходной информации о нуклеотидной последовательности генов предка современного *H. pylori* и, следовательно, нельзя достоверно выявить историю появления того или иного нуклеотидного мотива, например, ATGT. Таким образом, степень отличий нуклеотидных замен в случае

присутствии метилаз одного типа в обоих штаммах *H. pylori* будет невелика. Поэтому наблюдаемые нуклеотидные соответствия между GCGC-GTGC (6.6%), когда соответствующая метилаза активна в двух штаммах *H. pylori*, меньше, чем в случае, если активная метилаза присутствует только в одном штамме ACGT-ATGT (28.3%), но достоверно выше, чем соответствия между неметилованным С в нуклеотидном мотиве GCGC и Т в GCGT (3.3%). Влияние (следы) метилирования на частоту транзиций С→Т наиболее значительно проявляется только в том случае, когда один из сравниваемых штаммов обладает активной метилтрансферазой, а другой нет. Таким образом, если считать, что соответствие нуклеотидных мотивов по положению между двумя гомологичными геномными последовательностями организмов в пределах одного вида отражает нуклеотидные замены, произошедшие в популяции в процессе эволюции, то можно заключить, что в *H. pylori*, вероятно, протекают преимущественно мутации С→Т, обусловленные механизмом метилирования-дезаминирования цитозина.

Разработка метода оценки частоты транзиций С→Т с помощью реакции минисеквенирования с последующей масс-спектрометрией. Для проверки высказанного выше предположения, нами был разработан высокопроизводительный метод оценки частоты нуклеотидных транзиций С→Т в сайтах метилирования генома *H. pylori* J99 на основе реакции минисеквенирования с последующей MALDI-TOF масс-спектрометрией. Преимуществом предложенного метода является возможность масштабного мониторинга С→Т транзиций во всем геноме бактерии. Учитывая, что скорость дезаминирования цитозина возрастает в 2–4 раза при его предварительном метилировании в 5-ом положении, мы разработали систему минисеквенирования ACGT фрагментов, сайта метилирования активной метилтрансферазой М.Нру99ХI в штамме *H. pylori* J99.

Предварительно при анализе открытых рамок считывания *H. pylori* J99 было найдено всего 465 тетрануклеотидных мотивов ACGT, из них в 396 мотивах цитозин является третьим нуклеотидом в кодоне, соответственно замены цитозина на тимин в этом положении являются нейтральными и не подвергаются отбору. Для детекции замен цитозина в ACGT тетрануклеотиде с помощью реакции минисеквенирования были подобраны 396 праймеров (СНП-праймеры), комплементарные 20-25 п.н. участку ДНК, находящемуся непосредственно перед ACGT тетрануклеотидом (http://www.ripem.org.ru/2/2_1/2/2_5/head.php). В зависимости от нуклеотидной последовательности тетрануклеотида, СНП-праймеры достраиваются на два или три нуклеотида (рис. 10). Для амплификации фрагментов ОРС *H. pylori* использовали набор олигонуклеотидных праймеров Eurogentec (Бельгия). 792 праймера были подобраны для амплификации 328 ОРС *H. pylori*, включая старт и стоп кодоны. Штаммы *H. pylori* 26695 и J99 культивировали как описано ранее. Реакцию минисеквенирования с последующей MALDI-TOF масс-спектрометрией проводили по ранее разработанной методике. Учет результатов генотипирования производили на основании ожидаемых масс продуктов минисеквенирования – масса праймера плюс масса двух/трех нуклеотидов в зависимости от того произошла транзигия С→Т или нет. Результаты минисеквенирования, полученные с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF, подтверждали прямым секвенированием ДНК с помощью ABI Prism Genetic Analyzer 3100 (“Applied Biosystems”, США), согласно протоколам производителя.

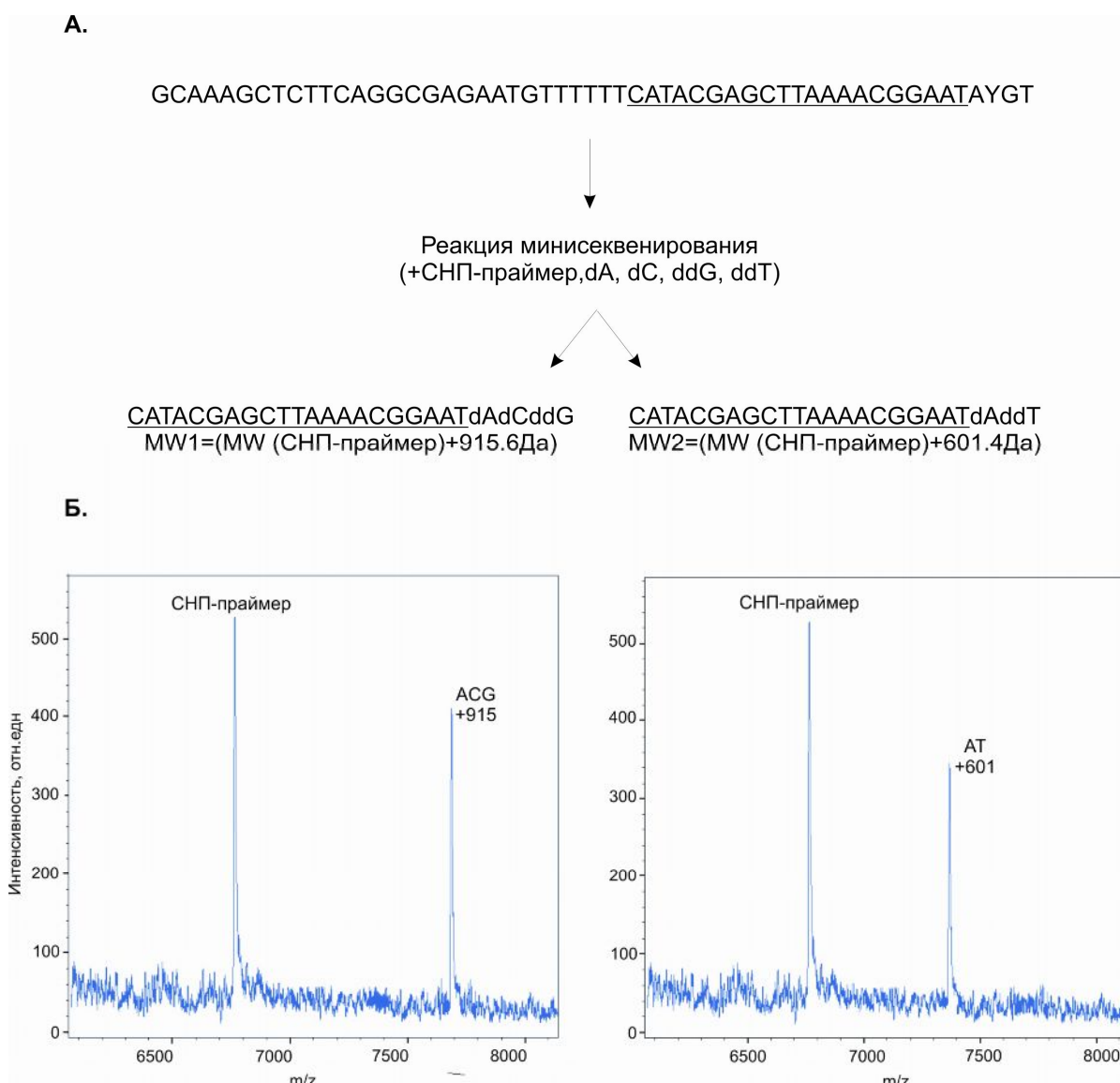


Рис. 10. А – Ожидаемые массы продуктов реакции минисеквенирования в зависимости от по полиморфизма второго нуклеотида в ACGT тетрануклеотиде. Б – MALDI-TOF-масс-спектры продуктов реакции минисеквенирования ACGT мотива (слева) и ATGT (справа)

Проверку разработанной системы проводили на двух штаммах *H. pylori*: 26695 и J99. Для тестирования были выбраны 23 гомологичных гена с идентичностью 97–98%, причем, если в штамме J99 эти гены имеют только ACGT мотивы, то в штамме 26695 таких мотивов только 12, остальные 11 – ATGT. Эксперимент повторяли три раза. В результате были обнаружены все указанные мотивы, в том числе и ATGT мотивы в 12 генах штамма 26695. Таким образом, аккуратность и воспроизводимость разработанного метода составила 100%. Учитывая, что анализ 291 возможных транзиций С→Т в специфических сайтах ACGT в геноме *H. pylori* J99 занимает 1.5 дня от амплификации фрагментов до получения результатов, разработанный подход будет использован в дальнейших экспериментах, связанных с влиянием модуляции активности метилтрансферазы на частоту транзиций С→Т в геноме *H. pylori*.

Вклад процессов метилирования в вирулентность H. pylori. Для того, чтобы выяснить, действительно ли метилирование ДНК *in vivo* является причиной структурной и/или функциональной гетерогенности, необходимо было инактивировать активные метилтрансферазы в *H. pylori*. Учитывая, что лабораторные штаммы *H. pylori* 26695 и J99 потеряли способность к трансформации, был проведен скрининг среди клинических штаммов *H. pylori* с целью выявления естественно компетентных штаммов. В результате скрининга 44 клинических штаммов *H. pylori* был найден один естественно компетентный штамм *H. pylori* A45. Далее, для идентификации активных метилтрансфераз клинического штамма *H. pylori* A45 были использованы два подхода: установление паттернов чувствительности/устойчивости геномной ДНК к обработке различными эндонуклеазами рестрикции и детекция метилированных нуклеотидов путем анализа хроматограмм, полученных с помощью автоматического секвенатора ABI PRISM 3100.

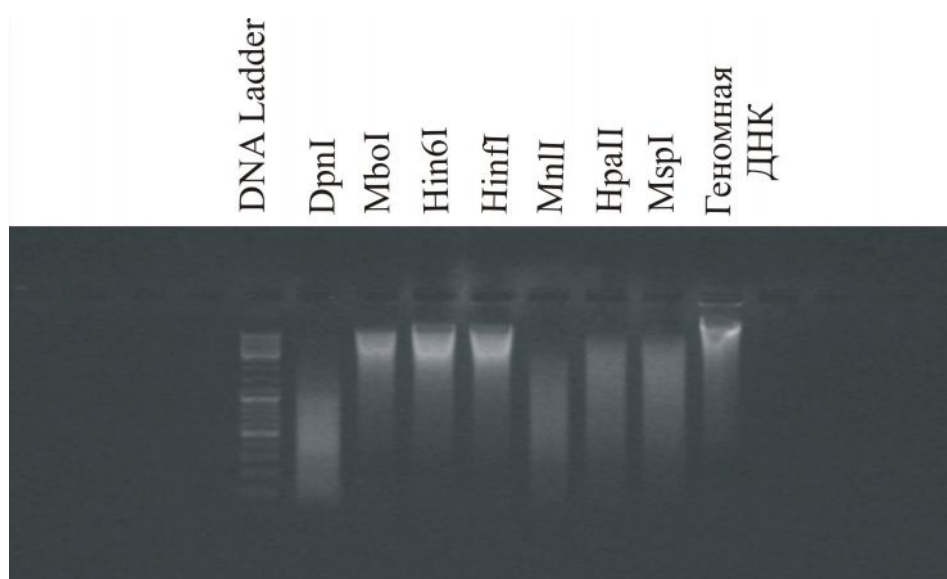


Рис. 11. Электрофореграмма геномной ДНК штамма A45 *H. pylori*, обработанной различными эндонуклеазами рестрикции

Результаты обработки геномной ДНК эндонуклеазами рестрикции после электрофореза в агарозном геле представлены на рис. 11. ДНК штамма A45 *H. pylori* оказалась устойчива к гидролизу рестриктазами MboI, Hin6I, HinfI и чувствительна к обработке DpnI, что свидетельствует о присутствии метилированных нуклеотидов в последовательностях GATC, GCGC и GANTC. Метилирование аденина и цитозина в этих последовательностях является результатом присутствия в клетке метилтрансфераз М.НруАIII, метилирующей аденин в последовательности GATC, М.НруАVIII, метилирующей внутренний цитозин в последовательности GCGC, и М.НруАIV, метилирующей аденин в последовательности GANTC. В штамме 26695 *H. pylori* эти метилтрансферазы кодируются генами *HP0092*, *HP1121* и *HP1352* соответственно.

Присутствие метилтрансферазы М.НруАVIII является ожидаемым, поскольку она присутствует у всех ранее проанализированных штаммов *H. pylori*. Вполне вероятно, что высококонсервативные метилтрансферазы М.НруАI и М.НруАVIII могут быть вовлечены в регуляцию каких-то важных клеточных процессов. Ранее было показано, что экспрессия М.НруАI повышается при контакте бактериальной клетки с клетками эпителия желудка, хотя

роль, которую этот белок может играть в ходе адгезии клеток *H. pylori* остаётся неясной. Метилтрансфераза М.НруАІІІ также является весьма распространённой и по данным разных авторов встречается у 95%, 98% и 100% проанализированных штаммов.

Получение производных штамма А45 H. pylori, дефектных по генам метилтрансфераз. Для получения производных штамма А45 *H. pylori*, дефектных по генам метилтрансфераз М.НруАІ, М.НруАІІ, М.НруАІV, М.НруАVІІІ была проведена их направленная инактивация методом генного нокаута с использованием встройки в геном кассеты, содержащей в качестве селективного маркера ген *aphA-3*, обуславливающего устойчивость к канамицину.

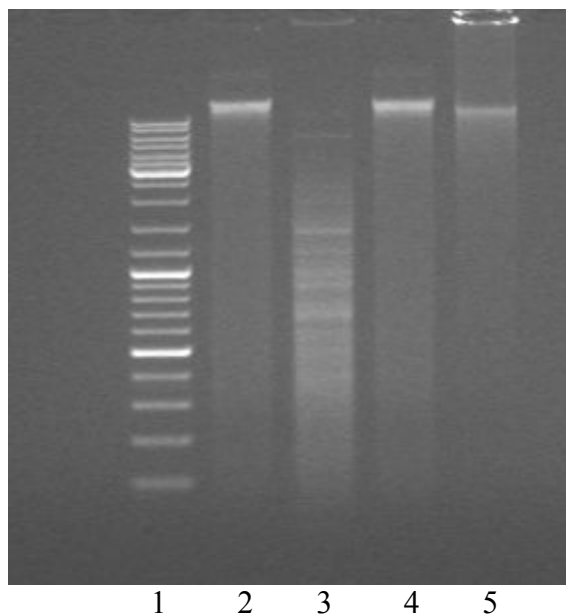


Рис. 12. Результаты электрофореза в агарозном геле геномной ДНК, обработанной эндонуклеазой рестрикции MboI, исходного штамма А45-3 и полученного штамма, содержащего нокаут генов, кодирующих метилтрансферазу и рестриказу системы НруАІІІ-М.НруАІІІ.

1 – маркер. 2 – геномная ДНК штамма А45-3, обработанная рестриктазой MboI. 3 – геномная ДНК штамма, содержащего нокаут генов, кодирующих метилтрансферазу и рестриказу системы НруАІІІ- М.НруАІІІ, обработанная рестриктазой MboI. 4 – геномная ДНК штамма А45-3. 5 – геномная ДНК штамма, содержащего нокаут генов, кодирующих метилтрансферазу и рестриказу системы НруАІІІ- М.НруАІІІ

Проверку правильности встройки кассеты в геном *H. pylori* проводили с помощью ПЦР-анализа и секвенирования. Инактивация мишеней – генов, кодирующих метилтрансферазы, была подтверждена рестрикционным анализом геномной ДНК полученных штаммов с помощью метилчувствительных эндонуклеаз рестрикции: MboI (GATC), Hin1II (CATG), Hin6I (GCGC), HinfI (GANTC). Изменение паттерна рестрикции геномной ДНК с устойчивого на чувствительный трактовалось как исчезновение метилирования в сайтах узнавания этих рестриктаз, связанное с инактивацией соответствующих метилтрансфераз. В качестве примера на рис. 12 приведены результаты электрофореза в агарозном геле обработанной эндонуклеазой рестрикции MboI геномной ДНК исходного штамма А45-3 и полученного штамма, содержащего нокаут генов, кодирующих метилтрансферазу и рестриказу системы НруАІІІ- М.НруАІІІ.

Оценка скорости роста полученных штаммов *H. pylori*. Большое число факторов определяет патогенность *H. pylori* и степень его вирулентности: подвижность клетки, механизмы адгезии, синтез уреазы, количество белков, узнающих рецепторы эпителиальных клеток и др. Так же *H. pylori* экспрессирует ряд токсинов, которые повреждают эпителиальные клетки как напрямую, так и опосредовано.

В ходе нашей работы была проанализирована скорость роста штаммов *H. pylori*, дефектных по М.НруAI, метилирующей аденин в последовательности CATG; дефектных по М.НруAIII, метилирующей аденин в последовательности GATC и дефектных по М.НруAVIII, метилирующей внутренний цитозин в последовательности GCGC (рис. 13). Как видно из представленных данных, все штаммы, дефектные по метилтрансферазам характеризовались сниженной скоростью роста по отношению к исходному штамму *H. pylori* A45. Наименьшая скорость роста была зарегистрирована для штамма *H. pylori*, дефектного по М.НруAIII, метилирующей аденин в последовательности GATC.

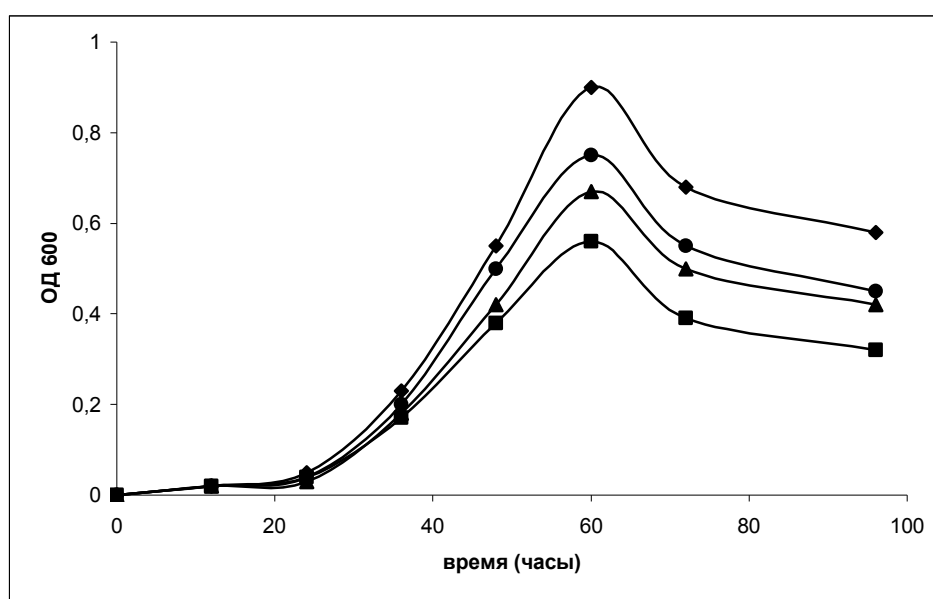


Рис. 13. Кривые роста штамма *H. pylori* A45 (♦); *H. pylori* дефектного по М.НруAI (●); *H. pylori* дефектного по М.НруAVIII (▲) и *H. pylori* дефектного по М.НруAIII (■).

Таким образом, вероятно, что замедление скорости роста штаммов *H. pylori* дефектных по метилтрансферазам связано с эпигенетическими событиями, т.е. метилирование ДНК *H. pylori* in vivo действительно является одной из причин функциональной гетерогенности бактерии.

3. Микрофлюидные технологии для оценки функциональной гетерогенности клеточных популяций

Обоснование модели. Изучение процессов, протекающих в живых системах, как правило, часто проводят на большом числе клеток, при этом измеряемый параметр является усреднённым значением и отражает суммарный ответ многих клеток. В ряде случаев подобный подход может приводить к неправильной интерпретации результатов, поскольку клеточная популяция является неоднородной и различные её субпопуляции имеют разные характеристики за счёт генетической гетерогенности, нахождения в разных стадиях клеточного цикла, вероятностной природы биохимических реакций в живых объектах и т.д.

Например, рассмотрим работы, посвященные поиску и анализу генов *H. pylori*, участвующих в адаптации бактерии к изменению pH среды. В работе Wen и коллег (2003) было идентифицировано 120 генов, экспрессия которых повышалась более чем в два раза при адаптации микроорганизма к среде pH 4.0. В то же время, Ang и коллеги (2001) нашли только 79 кислото-индуцируемых генов. Allan (2001) обнаружил только 7 генов, экспрессия которых изменялась более чем в два раза при понижении кислотности среды. Кроме того, данные Wen и Ang совпали только по 10 генам. Дискордантность данных, полученных при изучении адаптационных возможностей *H. pylori* к кислой среде, на наш взгляд, не может быть только связана с различным происхождением *H. pylori* штаммов. Подобная гетерогенность может быть обусловлена различными стадиями роста бактерий, фазами деления, дифференциации и т.д. Кроме того, показано как для бактерий, так и для эукариот, что даже в генетически идентичных и синхронизированных клетках паттерны экспрессии зависят от случайных флуктуаций, поэтому, чтобы исключить фактор гетерогенности популяции, измерение интересующего параметра необходимо проводить индивидуально для каждой клетки, что особенно информативно при использовании репортерных систем на основе флуоресцирующих белков.

Развитие технологии манипулирования индивидуальными бактериальными клетками является актуальной проблемой современной биологии, поскольку размер клетки, составляющий несколько микрометров, значительно ограничивает выбор средств для анализа отдельных живых микроорганизмов в режиме реального времени. Качественно новым подходом в изучении отдельных клеток является употребление микрофлюидных технологий, использующих миниатюризированные системы для контроля и управления потоками жидкостей или газов и реакциями, проходящими в них. Проведение химических и биологических процессов в микро- и нано-масштабе даёт ряд преимуществ, недостижимых в случае использования макросистем: оперирование с количествами жидкостей в границах от нано- до миллилитра, ускорение прохождения реакций, ограниченных диффузией веществ, снижение стоимости работ и количества отходов, повышение безопасности при работе с вредными веществами и патогенными микроорганизмами и т.д. В случае индивидуальных живых систем использование микрофлюидных платформ позволяет не только анализировать многие параметры индивидуальных клеток в реальном времени, но и с высокой точностью регулировать условия окружающей среды.

Описанные ранее микрофлюидные технологии для манипуляций с единичными клетками включают в себя (1) гидродинамическую транспортировку и фиксацию; (2) диэлектрофоретические методы; (3) прямую транспортировку и фиксацию клеток с помощью микроклапанов и микронасосов, интегрированных в чип; (4) оптические и оптоэлектронные методы; (5) механическое удерживание клеток и др. Для прямых наблюдений за процессами, происходящими в единичных клетках, хорошо подходят системы на основе Green Fluorescent Protein (GFP) или его аналогов, флуоресценция которого может регистрироваться в живых клетках. Флуоресценция GFP может быть зарегистрирована и количественно оценена в отдельных клетках, в отличие от ряда других репортерных систем, сигнал от которых может быть измерен только при суммарном ответе большого числа клеток.

Для производства микрофлюидных чипов с целью анализа живых клеток, экспрессирующих GFP, хорошо подходят такие материалы как полиметилметакрилат (PMMA) и полидиметилсилоксан (PDMS), поскольку они являются биосовместимыми материалами с хорошей оптической проницаемостью. В качестве основных требований к ним выдвигаются создание условий для длительного нахождения в них живых клеток, возможность точной регулировки параметров окружающей среды и наблюдений за клетками

в режиме реального времени. Таким образом, создание микрофлюидной платформы, адаптированной для задач, поставленных в эксперименте, вероятно будет являться одной из ключевых задач любого исследования, связанного с анализом отдельных клеток.

Конструирование микрофлюидного чипа. Нами был спроектирован и сконструирован микрофлюидный чип, выполненный из оптически проницаемого полиметилметакрилата, состоящий из сети микрофлюидных каналов с ячейками, ввод пробы в которые осуществлялся с помощью перистальтического насоса. Выбранная топология и способ ввода проб позволяют культивировать клетки *H. pylori* и осуществлять их иммобилизацию химическим способом с помощью лектинов. Иммобилизованные клетки могут культивироваться внутри микрофлюидных каналов в течение нескольких часов без потери жизнеспособности, о чем свидетельствуют зарегистрированные случаи деления клеток (рис. 14).

Микрофлюидный чип состоит из пяти независимых дорожек, каждая из которых имеет четыре канала, содержащих по 20 ячеек (рис. 14А). Чип сделан из полиметилметакрилата (PMMA) методом фотолитографии с последующим термическим связыванием поверхностей (Epigem, Великобритания). Микрофлюидный чип с помощью пластиковых коннекторов крепится на платформе (Epigem, Великобритания), позволяющей осуществлять ввод пробы с помощью перистальтического насоса 2232 Microperplex S (LKB Bromma, Швеция).

Маркерные штаммы, содержащие кодирующую последовательность GFP, находящегося под промоторами генов *sodB*, *flgB*, *rocF*, *ansB*. Для оценки работоспособности микрофлюидного чипа использовали рекомбинантные плазмиды, содержащие промоторные области генов *sodB*, кодирующего супероксиддисмутазу, *flgB*, кодирующего минорную субъединицу проксимального стержня жгутика, *rocF*, кодирующего аргиназу, *ansB*, предположительно кодирующего аспарагин синтазу. Использование промоторных областей генов, имеющих разные механизмы регуляции, позволяет оценить возможности применения предложенной модельной системы с участием GFP для *H. pylori*. Во всех штаммах *H. pylori*, содержащих генно-инженерные конструкции, была зарегистрирована флуоресценция GFP. В качестве отрицательных контролей использовались штамм A45 *H. pylori* дикого типа и штамм A45 *H. pylori*, содержащий плазмиду pHel2-MCS-promotorlessGFP, для которого было показано отсутствие флуоресценции.

В зависимости от используемой в рекомбинантной плазмиде промоторной области в маркерных штаммах наблюдался различный уровень флуоресценции GFP. Наибольший уровень флуоресценции наблюдался в клетках, содержащих кодирующую последовательность *gfp* под промотором гена *sodB*, присутствие которого требуется для роста бактерии в микроаэрофильных условиях и выживания в условиях окислительного стресса. В клетках, содержащих кодирующую последовательность GFP под промоторами генов *flgB* и *ansB*, был зарегистрирован промежуточный уровень флуоресценции; в клетках, содержащих кодирующую последовательность GFP под промотором гена *rocF*, был зарегистрирован наименьший уровень флуоресценции.

Иммобилизация клеток. Для иммобилизации клеток нами был предложен метод химической иммобилизации бактерий с помощью лектинов – белков, способных специфически связывать определённые углеводные части соединений, интегрированных в клеточную стенку: Concanavalin A связывается с остатками маннозы, Lectin tetragonolobus с остатками фукозы, Lectin *T. vulgaris* связывается с глюкозой в составе (GlcNAc)₂. В дополнение к этим лектинам в качестве компонента внеклеточного матрикса был использован фибронектин. Смесь этих компонентов наносилась на поверхности

микрофлюидной сети, после чего осуществлялся ввод пробы, содержащей клетки *H. pylori*, инкубация, смыв неприкреплённых клеток и регистрация иммобилизованных бактерий.

Эффективность иммобилизации в разных экспериментах составляла от 10^{-5} до 10^{-7} , что в ряде случаев является достаточным для проведения достоверного анализа (рис. 14Б). Показано, что иммобилизованные клетки могут культивироваться внутри микрофлюидных каналов в течение нескольких часов без потери жизнеспособности, о чем свидетельствуют зарегистрированные случаи деления клеток (рис. 14В).

Как уже отмечалось выше, характеристики индивидуальных клеток достаточно часто отличаются от усреднённых параметров, получаемых при анализе клеточных популяций. Разница в паттернах экспрессии отдельных клеток может быть выражена с помощью коэффициента вариальности (η), являющегося отношением стандартного отклонения параметра в популяции (σ) к среднему значению параметра в популяции (μ). На рис. 15 приведены результаты оценки интенсивности флуоресценции отдельных иммобилизованных в каналах микрофлюидного чипа клеток *H. pylori*, содержащих кодирующую последовательность *gfp* под промотором гена *flgB*.

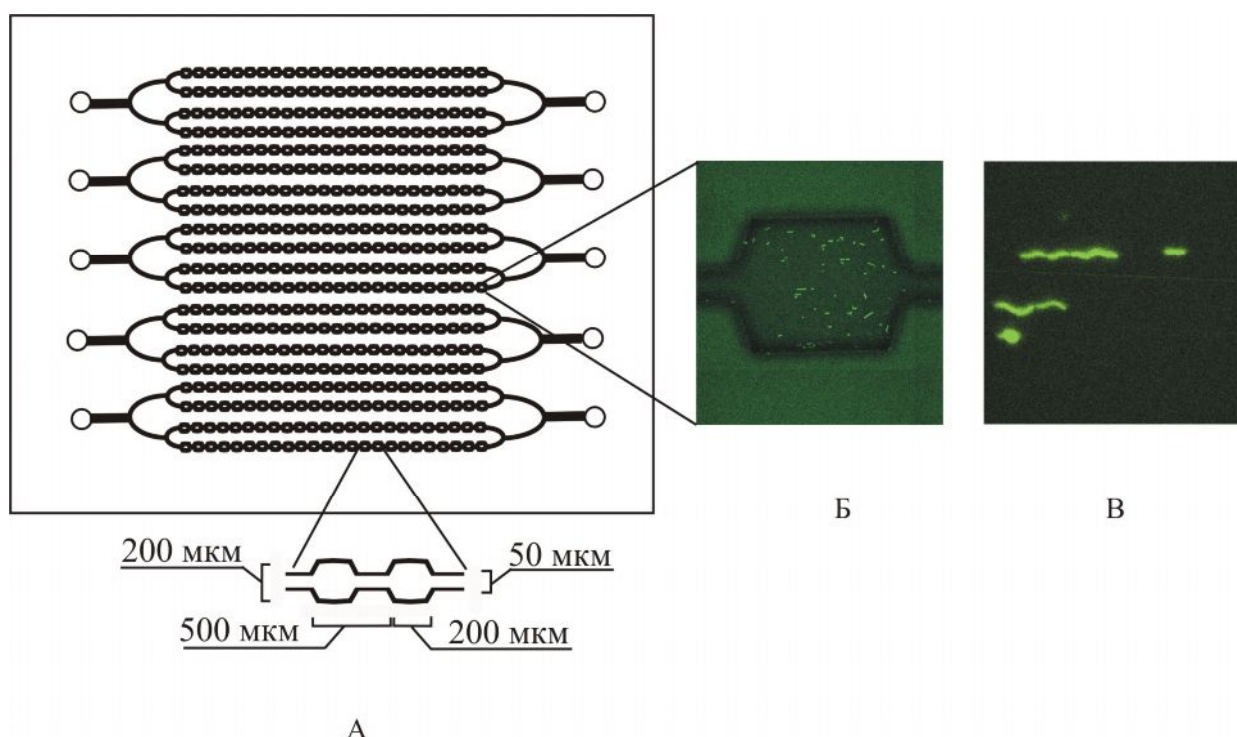


Рис. 14. А – схема микрофлюидного чипа; Б – клетки *H. pylori*, иммобилизованные в ячейке микрофлюидного чипа; В – делящиеся в ячейке микрофлюидного чипа клетки *H. pylori*

Для несинхронизированной популяции клеток, содержащих транскрипционную слияние промоторной области гена *flgB* и кодирующей части гена *gfp*, коэффициент вариальности интенсивности флуоресценции равен 0.23, что согласуется с расчетными данным о вариальности в количестве белка между клетками, находящимися в разных стадиях клеточного цикла – $\eta = 0.22$.

Продемонстрированная нами возможность регистрации флуоресценции в клетках *H. pylori*, иммобилизованных в микрофлюидных каналах чипа, позволяет анализировать гетерогенность бактериальной популяции и характеризовать ее отдельные клетки. Кроме того,

разработанный микрофлюидный чип может быть использован для создания клеточного эррея (array), элементом которой является единичные клетки несущие рекомбинатные плазмиды с репортерной системой на основе GFP-белка и промоторными областями генов в качестве сенсоров.

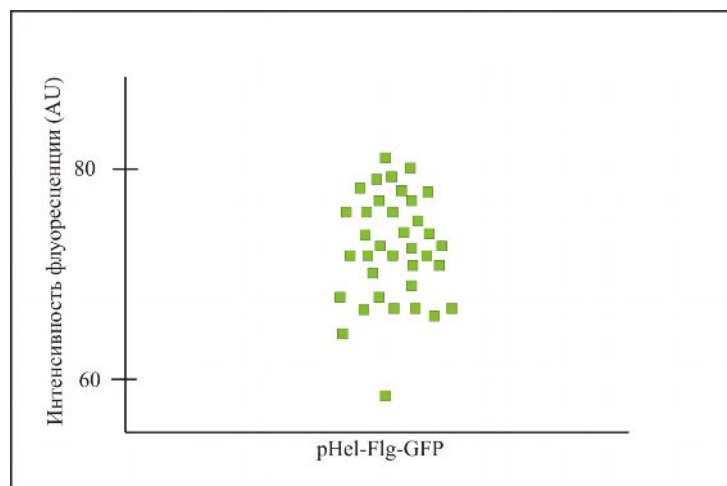


Рис. 15. Распределение интенсивности флуоресценции отдельных клеток *H. pylori*, содержащих плазмиду pHel-flg-GFP

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения данной работы нами были описаны границы структурной и функциональной вариабельности *H. pylori*. Показано, что микро- и макровариабельность *H. pylori* является следствием адаптации бактерии к окружающему стрессу. Основную часть вариабельных белков *H. pylori* при раннем раке желудка составляют белки-антиоксиданты, белки цикла трикарбоновых кислот и белки теплового стресса. При этом различие в экспрессии белков генетически идентичных *H. pylori* изолятов, выделенных из разных отделов желудка спустя несколько пассажей на искусственных питательных средах сохраняются. При адаптации бактерии к антибиотику, в качестве стрессового фактора, происходит накопление «случайных» мутаций не связанных и/или не обеспечивающих антибиотикоустойчивость.

При поиске причин, обуславливающих генетическую вариабельность бактерии, мы бы хотели обратить внимание на следующие факты. Если считать, что соответствие нуклеотидных мотивов по положению между двумя гомологичными геномными последовательностями организмов в пределах одного вида отражает нуклеотидные замены, произошедшие в популяции в процессе эволюции, то можно заключить, что в *H. pylori*, вероятно, протекают преимущественно мутации С→Т, обусловленные механизмом метилирования-дезаминирования цитозина. С другой стороны, следует принимать во внимание, что некоторые штаммы *H. pylori* содержат свыше 20 систем рестрикции-модификации (Р-М), подавляющее большинство которых относится ко II типу. Функция систем рестрикции-модификации у *H. pylori* не ограничивается созданием барьера, препятствующего поступлению в клетки чужеродной генетической информации. Основным аргументом в пользу этого можно считать большое число генов систем Р-М, занимающих более 4% всего генома!

Согласно эгоистической (selfish) природе существования систем рестрикции-модификации у прокариот, эти системы, содержащие активный ген *M* (метилтрансферазы) и неактивный ген *P* (рестриктазы), могут перемещаться из одного штамма *H. pylori* в другой, где ген *P* может снова реактивироваться или замещаться на новый активный ген *P*. С этой точки зрения, *H. pylori* может рассматриваться как резервуар для систем Р-М – в процессе эволюции бактерия может случайным образом приобретать и терять системы Р-М. Учитывая повышение скорости превращения цитозина в тимин под влиянием метилирования, 5mC метилтрансферазы можно рассматривать как потенциальные внутриклеточные мутагены. Поскольку мутации являются относительно редким событием, то их число зависит от продолжительности времени присутствия мутагена. Таким образом, время существования различных систем рестрикции-модификации в клетках бактерии может оказывать влияние на количество мутаций в соответствующих сайтах рестрикции-модификации. Другим фактором, ограничивающим частоту метилирования, является естественный отбор. Сайты системы Р-М могут быть расположены в структуре гена таким образом, что мутации в них понижают приспособляемость микроорганизма, и, как следствие, не наследуются. Этим же объясняются повышенные частоты замен в третьем положении кодона: поскольку транзиции в этом положении оказываются синонимичными, и они с большей вероятностью передаются потомству клетки.

Учитывая эти данные и полученные результаты, мы предполагаем следующую модель формирования микрогетерогенности геномов *H. pylori*. В настоящее время предполагается, что гетерогенность геномов хеликобактера в природе обусловлена спонтанными точечными мутациями или высокой частотой межштаммовых и внутригеномных рекомбинационных событий. По нашему мнению, «спонтанное» образование однобуквенных транзиций, которое может эффективно модулироваться системами рестрикции-модификации, являющихся, в свою очередь, также вариабельной частью генома, делает два вышеуказанных предположения о механизмах формирования гетерогенности элементами одной системы. Мы предполагаем, что возможно рассматривать процессы дезаминирования цитозина как химическую реакцию, определяющую формирование микрогетерогенности, с последующим включением рекомбинационных процессов, формирующих множество гетерогенных локусов ДНК у *H. pylori*, выщепление фрагментов генома и их горизонтальный перенос, варьирование количества и активности систем рестрикции-модификации.

Необходимо добавить, что в отсутствие окружающего стресса популяция *H. pylori* вероятно содержит изначально некое количество клеток с гипермутабельным фенотипом или же они появляются в популяции спустя некоторое количество генераций. Данное предположение основывается на анализе геномов рифампицинрезистентных штаммов, в которых были обнаружены мутации, не связанные с процессом адаптации *H. pylori* к рифампицину, так как ни одна из этих мутаций не появляется при адаптации *H. pylori* к антибиотику. Однако, учитывая, что пять мутаций T389863C, Ins597760T, G748722T, T189153G, Del1487684GA, оказались общими для двух мутантных штаммов P1 и P2, причем, частично они были найдены в дополнительно проанализированных рифампицинустойчивых штаммах *H. pylori* можно предположить, что эти мутации, могли уже предсуществовать в популяции до селекции, т.е. генерировались случайным образом гипермутаторными клетками в популяции. Тогда обнаруженные мутации в рифампицинустойчивых *H. pylori* штаммах являются лишь отражением того, что отбору подвергаются только гипермутабельные клетки. Другими словами, рифампицин выступает в качестве агента, фиксирующего мутации в гипермутабельных клетках до селекции. Следует отметить, что гипермутабельные клетки не могут быть зафиксированы в бактериальной популяции, поскольку вероятность появления вредных (deleterious) мутаций достаточно велика, и они

имеют более пониженный фитнес, чем клетки с устойчивыми геномами в неселективных условиях окружающей среды. Однако в стрессовых условиях, каковыми является новая ниша или антибиотик только эти гипермутабельные клетки имеют шанс пройти через селективный отбор за счет высокой скорости мутационных процессов.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена популяционная принадлежность штаммов *H. pylori* выделенных на территории России. Показано, что выделенные штаммы преимущественно принадлежат к европейской (hpEurope) популяции. Однако, среди штаммов *H. pylori* выделенных от народов, проживающих компактно в Сибири обнаружена новая *H. pylori* субпопуляция – hspSiberia и штаммы hspAmerind субпопуляции. Полученные данные позволили предположить пути миграции человека в Северную Америку через Аляску.
2. Описаны границы структурной и функциональной вариабельности клинических изолятов *H. pylori*. Показано, что 1271 генов (81% всех генов) в геноме составляют функциональное ядро генома *H. pylori*, а 19% являются вариабельными. Изучение транскрипционных профилей клинических штаммов *H. pylori* показало, что коэффициент корреляции между суммарными транскрипционными профилями составляет 0.70–0.83. На протеомном уровне зафиксировано изменение экспрессии мажорных белков, в том числе, белков домашнего хозяйства клетки, ферментов инактивации свободных радикалов и пероксида водорода, компонент липопротеина клеточной стенки.
3. Показано, что микро- и макровариабельность *H. pylori* является следствием адаптации бактерии к окружающему стрессу. Основную часть вариабельных белков *H. pylori* при раннем раке желудка составляют белки-антиоксиданты, белки цикла трикарбоновых кислот и белки теплового стресса. Кроме того, показано, что при адаптации бактерии к рифампицину, как стрессового фактора, происходит накопление мутаций, не связанных и/или не обеспечивающих антибиотикоустойчивость.
4. Для оценки функциональной вариабельности *H. pylori* популяции разработан микрофлюидный чип, выполненный из оптически проницаемого полиметилметакрилата, состоящий из сети микрофлюидных каналов с ячейками. Отработаны условия для длительного нахождения в них живых клеток, возможность точной регулировки параметров окружающей среды и наблюдений за клетками в режиме реального времени.
5. В качестве одной из возможных причин возникновения генетической вариабельности геноме *H. pylori* исследовано метилирование ДНК. Показано, что в геноме *H. pylori* преобладают нуклеотидные замены по типу транзиций над трансверсиями. Преобладание транзиций обусловлено высокой скоростью перехода цитозина в тимин в кодирующей цепи ДНК и не кодирующей. Показано, что штаммы *H. pylori* с инактивированными метилтрансферазами характеризуется замедленной скоростью роста, чем штамм исходного, дикого типа, что свидетельствует об эпигенетической компоненте регуляции жизнедеятельности бактерии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Маев И.В., Момыналиев К.Т., Селезнева О.В. Эффективность эрадикации *Helicobacter pylori* в зависимости от полиморфизма IL-1 β -511. Материалы 10-го юбилейного международного Славяно-Балтийского форума "Санкт-Петербург – Гастро-2008" // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. - 2008.- № 2-3.-С.61.
2. Маев И.В., Момыналиев К.Т., Оганесян Т.С., Казюлин А.Н., Кучерявый Ю.А., Селезнева О.В. Полиморфизм гена интерлейкина-1 β в оценке эффективности эрадикационной терапии язвенной болезни, ассоциированной с *H. pylori*. // Клинико-эпидемиологические и этно-экологические проблемы заболеваний органов пищеварения. Материалы VIII Восточно-Сибирской гастроэнтерологической конференции. // Под ред. проф. Цуканова В. – Красноярск, – 2008.– С.127-134.
3. Маев И.В., Оганесян Т.С., Момыналиев К.Т., Кучерявый Ю.А., Белый П.А. - Полиморфизм гена цитохрома P-450 2C19 и лечение инфекции *Helicobacter pylori*. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.- 2008.- №3. – С.78-85.
4. Momynaliev K. T., Kashin S. V., Chelysheva V. V., Selezneva O. ., Demina I. A., Serebryakova M. V., Ivanisenko V. A., Aman E., Akopian T., Govorun V. M. Functional divergence of *H. pylori* related to early gastric cancer. // *Helicobacter*. - 2008.- V.13.- №.5 – P.477.
5. Momynaliev K. T., Chelysheva V. V., Selezneva O. V., Akopian T. A., Govorun V. M. Comparative genome sequencing of *H. pylori* rifampicin-resistant strains. // *Helicobacter*. - 2008.- V.13. - №.5 - P.465.
6. Маев И.В., Кучерявый Ю.А., Момыналиев К.Т., Говорун В.М., Т.С. Оганесян. Полиморфизм гена CYP2C19 и эффективность антихеликобактерной терапии у больных язвенной болезнью. // Фарматека. -2008.-№13. – С.98-102.
7. Момыналиев К.Т., Лазарев В.Н., Кострюкова Е.С, Чельшева В.В., Селезнева О.В., Кравченко Е.В., Говорун В.М. Микрофлюидные технологии для детекции внутриклеточных процессов в бактериальной клетке // Российские нанотехнологии.- 2007. - Т.2 - №5-6. - С.126-132
8. Оганесян Т.С., Маев И.В., Момыналиев К.Т., Говорун В.М., Казюлин А.Н., Моржакова А.А. Влияние полиморфизма IL-1 β -511 на эффективность эрадикации *H. pylori* у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки// Росс. журнал гастроэнтер., гепатол., колопрокт. – 2007. – №5. – Т.17. – С.164.
9. Маев И.В., Момыналиев К.Т., Оганесян Т.С., Казюлин А.Н. Моржакова А.А, Кучерявый Ю.А Эффективность эрадикации *Helicobacter pylori* у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки в зависимости от полиморфизма гена CYP2C19. // Росс. журнал гастроэнтер., гепатол., колопрокт. - 2007 – 5.- Т.17.- С.137.
10. Rogov S. I., Momynaliev K. T., Govorun V. M. Coexpressionfinder: a new algorithm for finding groups of coexpressed genes // J. Bioinform. Comput. Biol.- 2006. - V.4. - P.853-864.
11. Momynaliev K. T., Govorun V. M. System level analysis of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori*. // Abst. 3rd International Conference "Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanotechnologies for Medicine. - Novosibirsk. – 2006. – P.32
12. Prokhorenko I. A., Malakhov A. D., Kozlova A. A., Momynaliev K., Govorun V. M., Korshun V. A. Phenylethynylpyrene-labeled oligonucleotide probes for excimer fluorescence SNP analysis of 23S rRNA gene in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains // *Mutat. Res.*- 2006. - V.599. - P.144-151.
13. Момыналиев К.Т., Рогов С.И., Говорун В.М.. Соответствие нуклеотидов между белок-кодирующими последовательностями штаммов *Helicobacter pylori* 26695 и J99 // Молекул. биол.- 2005. - Т.39. - №6. -С.945-951.

14. Момыналиев К.Т., Говорун В.М. Комплексная характеристика клинических штаммов *Helicobacter pylori* // Молекул. мед.- 2005. - Т.4. - С.30-34.
15. Момыналиев К.Т., Рогов С.И., Селезнева О.В., Челышева В.В., Акопиан Т.А., Говорун В.М.. Сравнительный анализ транскрипционных профилей штаммов *Helicobacter pylori* // Биохимия.- 2005. - Т.70. - С.467-475.
16. Момыналиев К.Т., Селезнева О.В., Козлова А.А., Верещагин В.А., Ильина Е.Н., Говорун В.М.. A2144G – основная мутация в гене 23S rRNA *Helicobacter pylori*, ассоциированная с устойчивостью к кларитромицину // Генетика.- 2005. - Т.41. -№10. - С.1338-1344.
17. Момыналиев К.Т., Селезнева О.В., Челышева В.В., Акопиан Т.А., Линц Б., Ахтман М., Говорун В.М. Популяционная идентификация российских штаммов *H. pylori* // Генетика.- 2005. - Т.41. - С.1434-1437.
18. Говорун В.М., Лохов П.Г., Мошковский С.А., Момыналиев К.Т., Селезнева О.В., Кудрявцева Л.В., Серебрякова М.В., Тихонова О.В., Гоуфман Е.И., Арчаков А.И.. Сравнительный анализ различных методов типирования клинических штаммов *Helicobacter pylori* // Биохимия. - 2004. - Т.69. - С. 536-541.
19. Momynaliev K., Smirnova O., Kudryavtseva L., Govorun V. *Helicobacter pylori* genotypes in Russia // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. - 2003. - V.22. - P.573-574.
20. Момыналиев К.Т., Смирнова О.В., Челышева В.В., Кудрявцева Л.В., Воробьев А.А. Говорун В.М. Генотипирование клинических штаммов *H. pylori* в России // Вестник РАМН. - 2003. – Т.6. - С. 33-38.
21. Говорун В.М., Момыналиев К.Т., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Згода В.Г., Гоуфман Е.И., Серебрякова М.В., Лохов П.Г., Торопыгин И.Ю., Кудрявцева Л.В., Селезнева О.В., Арчаков А.И. Сравнительная характеристика протеомных карт клинических штаммов *Helicobacter pylori* // Биохимия. - 2003. - Т.68. - С. 42-49.
22. Момыналиев К.Т., Смирнова О.В., Кудрявцева Л.В., Говорун В.М. Сравнительный геномный анализ штаммов *Helicobacter pylori* // Молекул. биол. - 2003. - Т.37. -С.625-633.
23. Momynaliev K.T., Govorun V.M., Gnedenko O., Ivanov Y.D., Archakov A.I. The use of the resonant mirror biosensor to detect point mutations, as demonstrated with synthetic oligonucleotides // J. Mol. Recognit. - 2003. - V.16. - P.1-8.
24. Momynaliev K.T., Smirnova O., Kudryavtseva L., Govorun V. Global gene expression analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates. // *Helicobacter*. - 2003.- V.8. - P.491.
25. Govorun V. M., Momynaliev K. T., Kudriavtseva L. V. et al. Molecular typing of the *Helicobacter pylori* clinical isolates in Russia by genome and proteome analysis. // Abst. International Conference “Genomics, Proteomics and Bioinformatics for Medicine” St. Petersburg – Moscow - 24-30 June 2002- PP2-2.
26. Говорун В.М., Момыналиев К.Т., Кудрявцева Л.В. и др. Географическое распределение *cagA*, *vacA*, *iceA* и *babA* *Helicobacter pylori* типов и субтипов в российской Федерации // Экспер. Клинич. Гастроэнтер. - 2002. - Т.1. - С.124-125.
27. Говорун В.М., Момыналиев К.Т., Смирнова О.В. и др. Современные подходы к молекулярной диагностике и типированию клинических штаммов *Helicobacter pylori* в России // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2002. - Т.3. - С.57-65.
28. Govorun V., Momynaliev K., and Lokhov P. Molecular typing of the *H. pylori* clinical isolates in Russia by genome and proteome analysis. // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2002. – V.1.- №9 – P.657.

29. Momynaliev K. T., Govorun V. M., Isakov V. A., Megraud F.. Detection of point mutations associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin by real-time fluorescence based analysis. // Gut. - 2001. - Suppl. 11 - V.47. - A10.
30. Момыналиев К.Т., Говорун В.М., Иванов Ю.Д., Арчаков А.И. Мегро Ф. Использование резонансного зеркала для обнаружения точечных мутаций, ассоциированных с устойчивостью *Helicobacter pylori* к кларитромицине. // В тезисах 4-го Международного семинара «Российские технологии для индустрии». Санкт-Петербург. - 2000. - С.206.
31. Momynaliev K. T., Govorun V. M., Isakov V. A., Megraud F., Archakov A.I.. Detection of point mutation associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin by optical biosensors. // Gut. - 2000.- Suppl. 1. - V.47. - A20.

Использованные сокращения:

КИРИЛЛИЦА

АФК, активные формы кислорода

кДНК, комплементарная ДНК

мРНК, матричная РНК

ПЦР, полимеразная цепная реакция

ОРС, открытая рамка считывания,

РИФ, рифампицин,

РИФ^р, рифампицин-устойчивые изоляты

НрРР, *H. pylori* изоляты, выделенные от пациента с ранним раком желудка

НрХГ, *H. pylori* изоляты, выделенные от пациента с хроническим гастритом

МИК, минимальная ингибирующая концентрация

ИСГ, интенсивность сигналов гибридизации

ГПГ, горизонтально перенесенные гены

ЛАТИНСКИЙ РЕГИСТР

2DE, англ. two dimensional electrophoresis, двумерный электрофорез

PAI, англ. pathogenecity island; островок патогенности

PMMA, англ. *Poly*(methyl methacrylate), полиметиметакрилат