

**ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической
медицины» ФМБА России**

На правах рукописи

Фисунов Глеб Юрьевич

**Функциональная геномика микоплазм при адаптации к стрессовым
условиям внешней среды**

03.01.04 – Биохимия
03.01.03 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., профессор, член-корр. РАН Говорун Вадим Маркович

Москва – 2014

Оглавление

Оглавление	2
1. Введение	3
1.1 Научная новизна и значимость работы	3
1.2. Цели и задачи	12
1.3. Обзор литературы	13
<i>Молекулярные системы бактерий, участвующие в адаптации к стрессу</i>	13
<i>Потенциальные регуляторы в геноме <i>Mycoplasma gallisepticum</i></i>	25
<i>Механизмы регуляции стрессового ответа у других бактерий</i>	35
<i>Адаптивные механизмы <i>Mycoplasma gallisepticum</i></i>	38
2. Материалы и методы	40
2.1. Культуральные работы	40
2.2. Приготовление препаратов ДНК, РНК, белка	41
2.3. Секвенирование генома <i>Mycoplasma gallisepticum</i> S6	45
2.4. Измерение транскрипционной активности <i>M. gallisepticum</i> (транскриптомика)	48
2.5. Протеомный анализ <i>M. gallisepticum</i> (протеомика)	57
2.6. Биохимические исследования	62
3. Результаты	63
3.1. Определение полной нуклеотидной последовательности генома <i>M. gallisepticum</i> S6	63
3.2. Транскрипционный анализ <i>M. gallisepticum</i>	63
<i>Обработка биологических моделей стрессовых воздействий</i>	63
<i>Обработка технологии фрагментации РНК</i>	64
<i>Обработка технологии нормализации транскриптомных библиотек</i>	66
<i>Воспроизводимость количественных данных по представленности транскриптов</i>	73
<i>Полногеномное картирование сайтов инициации транскрипции и структура промоторов <i>M. gallisepticum</i></i>	74
<i>Организация транскрипционных единиц в геноме <i>M. gallisepticum</i></i>	81
<i>Некодирующие РНК в геноме <i>M. gallisepticum</i></i>	85
<i>Транскрипционный ответ <i>M. gallisepticum</i> на стрессовые воздействия</i>	86
<i>Ингибиторный анализ транскрипционного ответа <i>M. gallisepticum</i></i>	103
3.3. Протеомный анализ <i>M. gallisepticum</i>	105
<i>Анализ функционального протеомного ядра молликут в стрессовых воздействиях</i>	105
<i>Белковый ответ <i>M. gallisepticum</i> на стрессовые воздействия</i>	108
3.4. Модель стрессовой адаптации <i>M. gallisepticum</i>	113
4. Заключение	115
5. Выводы	117
6. Список литературы	118
7. Список иллюстраций	126
8. Приложение	128
8.1. Транскрипционное профилирование генов <i>M. gallisepticum</i> методом высокопроизводительного секвенирования	128
8.2. Транскрипционное профилирование генов <i>M. gallisepticum</i> методом ОТ-ПЦР в реальном времени	152
8.3. Измерение представленности белков <i>M. gallisepticum</i>	158

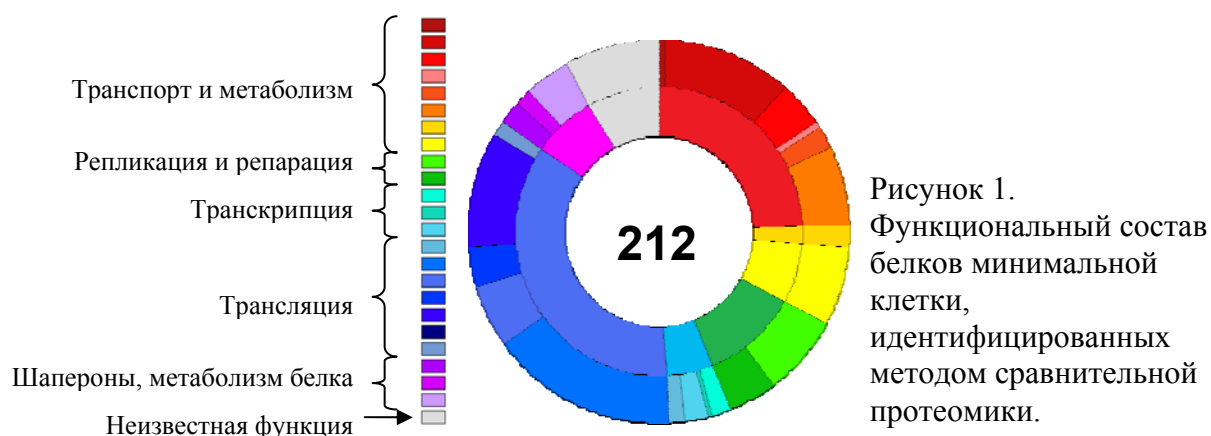
1. Введение

1.1 Научная новизна и значимость работы

Микоплазмы – представители класса Молликут (*Mollicutes*). Термины микоплазмы и молликуты в настоящее время стали, в значительной степени, синонимами, хотя традиционная классификация выделяет в классе молликут род *Mycoplasma*. В настоящей работе эти термины будут употребляться как эквивалентные. Молликуты – специализированная ветвь микроорганизмов, родственная грамм-положительным бактериям и, в частности, *Lactobacillus* [1]. Микоплазмы являются, как правило, облигатными паразитами, но среди них встречаются комменсалы, а также свободноживущие виды, которые могут быть факультативными паразитами [2]. Среди облигатных паразитов также встречаются внутриклеточные, такие как *Mycoplasma penetrans*. Впервые представитель микоплазм был выделен в 1898 году Нокардом и Ру [3]. Это был возбудитель бычьей плевропневмонии, впоследствии получивший название *Mycoplasma mycoides*. Таким образом, история изучения микоплазм насчитывает более ста лет. Таксономическая принадлежность микоплазм долгое время оставалась неясной, вследствие ряда особенностей, нехарактерных для большинства бактерий. Это является, в свою очередь, следствием высокой специализации микоплазм к паразитическому образу жизни. Одним из главных отличий молликут от большинства бактерий является полное отсутствие клеточной стенки. В связи с этим, в прошлом молликут часто отождествляли с L-формами бактерий [4]. Микоплазмы также отличаются меньшим, по сравнению с большинством бактерий, размером. Средний размер микоплазм составляет 500-600 нм вдоль длинной оси клетки [5]. Клетки микоплазм, ввиду отсутствия клеточной стенки, имеют неправильную форму, близкую к грушевидной. При

этом клетки молликут являются чрезвычайно пластичными, что вкупе с небольшим размером позволяет микоплазмам проходить через большинство фильтров, задерживающих обычных бактерий [6].

Другой важной особенностью микоплазм является редукция генома и связанная с ней общая редукция молекулярных систем клетки, что, по-видимому, обусловлено паразитическим образом жизни [7]. Размеры бактериальных геномов могут варьировать от 180 тысяч пар оснований (п.о.) у облигатного внутриклеточного симбионта *Carsonella rudii* до 13 миллионов п.о. у почвенного микроорганизма *Sorangium cellulosum*. Распределение длин известных бактериальных геномов имеет бимодальную структуру с двумя пиками в области 2 и 5 миллионов п.о. Это обстоятельство позволяет разделить бактерий на две категории – с «большими» и «маленькими» геномами [8]. Молликуты относятся ко второй категории и их геномы насчитывают порядка миллиона п.о. *Mycoplasma genitalium* с геномом в 580 тысяч п.о. является бактерией с наименьшим геномом, способной расти на искусственной питательной среде. Определение полной нуклеотидной последовательности генома *Mycoplasma genitalium* послужило поводом для дискуссии о «минимальной клетке» и «минимальном геноме» [9]. Проблема минимальной клетки была сформулирована вскоре после опубликования первых последовательностей полных геномов. Задача о минимальной клетке ставит вопрос, сколько белков (и соответствующих генов) необходимо и достаточно для того, чтобы клетка могла делиться на искусственной питательной среде. Сравнительная геномика, в зависимости от количества рассматриваемых видов, в разное время давала результат от 250 [10] до 50 [11] генов. Инактивация генов *M. genitalium* с помощью транспозонов в двух разных экспериментах позволила определить, что 265 и 350 из 517 генов являются необходимыми [12]. Сравнительный протеомный подход для трёх видов микоплазм позволяет определить 212 минимально необходимых белков (Рисунок 1) [13].



Помимо этого, для микоплазм характерно низкое содержание ГЦ-оснований в геноме, составляющее в среднем 30% [6]. Это, в свою очередь, порождает ряд вопросов касательно стабильности ДНК такого состава. АТ-богатая ДНК легко подвергается плавлению, что требует дополнительного механизма стабилизации даже при физиологических условиях. Биологический смысл такого экстремального состава ДНК микоплазм неясен. Некоторые особенности микоплазм указывают на существование давления отбора, способствовавшего снижению доли ГЦ-оснований в геноме. В частности, у микоплазм редко или не встречается триптофановый кодон UGG, а его функцию выполняет менее ГЦ-богатый кодон UGA, являющийся у большинства организмов стоп-кодоном. При этом соответствующий фактор терминации трансляции RF-3 потерян. Также снижение доли ГЦ связывают с несовершенством системы репарации ДНК у микоплазм, что приводит к недостаточно эффективной репарации последствий дезаминирования цитозина. Надо при этом отметить, что урацил-ДНК-гликозилаза у микоплазм присутствует.

Молликуты, за редким исключением, обладают значительно редуцированным метаболизмом, основным компонентом которого, чаще всего, является гликолиз. При этом, у ряда урогенитальных микоплазм основой метаболизма является путь утилизации аргинина, что связано с особенностями занимаемой ниши [14]. Почти все метаболические пути, связанные с метаболизмом аминокислот, азотистых оснований и липидов у микоплазм

отсутствуют. Большинство необходимых веществ они поглощают из среды с помощью развитой системы мембранных транспортёров.

В связи с паразитическим образом жизни у микоплазм развилась уникальная специализированная структура – терминальная органелла. Она выполняет несколько функций, включая подвижность, прикрепление к клеткам хозяина и проникновение внутрь них, а также она участвует в клеточном делении [5], [15].

Помимо общей редукции генома для микоплазм характерна редукция известных систем регуляции экспрессии генов. Вследствие этого было принято считать, что все системы регуляции экспрессии генов у микоплазм подверглись редукции. В последнее время появились работы, в которых показано наличие регуляции экспрессии генов микоплазм, однако механизмы регуляции остаются неизвестными. Необходимо отметить, что существует проблема неаннотированных генов в геномах микоплазм. Так, например, частично эта проблема обусловлена недостатком систем автоматической аннотации геномов. О функции 30% генов в геноме *M. gallisepticum* неизвестно ничего, и многие из них не имеют гомологов в других организмах. Как минимум часть адаптивных механизмов может быть скрыта внутри этих 30%, тем более, что для микоплазм характерна консервативность генов, отвечающих за базовые механизмы работы клетки, а адаптивные системы зачастую видоспецифичны.

Сама по себе, адаптация к стрессу может происходить разными путями. Наиболее распространённый – увеличение экспрессии генов защитных белков, причём, как правило, подобная регуляция происходит на уровне транскрипции. При этом, однако, могут реализовываться и другие механизмы, например, транспортировка в клетку низкомолекулярных соединений, обладающих протективными, в частности, антиоксидантными и осмопротекторными свойствами. Может происходить интенсификация работы существующих защитных систем. Регуляция экспрессии генов может осуществляться как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции, причём в последнем случае

регуляторы могут иметь небелковую природу. В частности, регуляция может идти с участием рибопереключателей и некодирующих РНК.

До настоящего времени единственным регулятором экспрессии генов, для которого полностью известен механизм работы, для большинства молликут является репрессор белков теплового шока HrcA. Другой важной особенностью молликут является отсутствие LexA репрессора SOS-ответа [16]. При этом гипотетические гены регуляторов можно обнаружить, но механизм их работы остаётся неизвестным. Биоинформатический поиск регуляторов и сайтов связывания, исходя только из геномных данных, даёт противоречивые результаты. Обнаружить мотивы кроме CIRCE (сайт связывания HrcA) пока не удалось и вряд ли удастся без привлечения дополнительных экспериментальных подходов. Такие данные должны давать информацию, как об организации транскрипционных единиц, так и о мотивах узнавания транскрипционных факторов. Для решения этой задачи в данной работе было проведено полногеномное картирование промоторов и оперонов, а также проведён поиск потенциальных транскрипционных факторов методами биоинформатики.

Подавляющее большинство исследований адаптации молликут к стрессу сводятся, в основном, к изучению палитры изменений на уровне транскрипции. При этом наиболее распространённым методом измерения является гибридизация на экспрессионных микрочипах. Такой метод позволяет измерять активность большого числа генов, хотя точность технологии позволяет наблюдать преимущественно значительные изменения и оставляет без внимания события, связанные с активностью некодирующих РНК или белков-регуляторов.

В работе Hertman и др. [17] было проведено исследование ответа *M. pneumoniae* на тепловой стресс с помощью экспрессионных микрочипов. Было показано, что в ответе на тепловой стресс задействовано 47 генов, как увеличивающих, так и уменьшающих транскрипцию. Гены, увеличивающие транскрипцию, включали шапероны, рибосомальные белки, некоторые метаболические ферменты и ряд белков с неизвестной функцией. В работе Madsen и др. [18] было проведено аналогичное исследование на *M.*

hyopneumoniae. В результате было обнаружено изменение транскрипции 91 гена, из которых 54 не имели аннотированных функций на тот момент. Функциональный репертуар генов, увеличивавших транскрипцию при тепловом стрессе у *M. hyopneumoniae* был похожим на тот, который наблюдался у *M. pneumoniae*. В эту группу входили шапероны, рибосомальные белки и некоторые ферменты. Musatovova и др. [19] проводили исследование ответа на тепловой стресс у *M. genitalium*. Это исследование концентрировалось преимущественно на известных белках ответа на тепловой стресс. В результате авторами наблюдалась чрезвычайно маленькая амплитуда транскрипционного ответа даже тех генов, которые должны были заведомо индуцироваться. В частности, максимальная амплитуда индукции составляла 5 раз для гена *clpB*. При этом для других генов она была ещё ниже.

Большой объём работ по изучению ответа микоплазм на стресс был проделан международным консорциумом под руководством L. Serrano [20]. В качестве модельного объекта была использована *M. pneumoniae*. В данной серии работ был использован широкий репертуар условий, которые включали: времена роста 2, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 часа, тепловой стресс 20, 30 и 60 минут, осмотический стресс и обработку митомицином. Также были использованы штаммы, конститутивно экспрессирующие ряд регуляторов включая RpoE, SpxA, HrcA, Fur, GntR и MPN626 (кандидатный альтернативный σ -фактор). Транскрипционное профилирование проводилось двумя методами – гибридизацией с микрочипами (tiling array) и высокопроизводительным секвенированием. Результаты этой работы являются неоднозначными. С одной стороны, было зафиксировано изменение транскрипции в стрессовых условиях. Однако, амплитуда изменения была невелика, что впрочем наблюдалось и ранее для других видов микоплазм. Так максимальное изменение транскрипции в тепловом стрессе составило 5 раз для гена *clpB*. В тепловом стрессе наблюдалось изменение 98 генов более чем в полтора раза. Из них 49 увеличивали транскрипцию. В осмотическом стрессе наблюдалось изменение транскрипции 149 генов, а при обработке митомицином 63 генов.

Несмотря на объём проделанной работы, механизмы регуляции транскрипции остались невыясненными. Авторы делают вывод, что даже CIRCE-зависимые гены (CIRCE - Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression) регулируются сложнее, чем только с помощью HrcA. При этом, большинство регуляторных событий не могут быть объяснены. Даже исследование штаммов с конститутивной экспрессией ряда транскрипционных факторов не помогло выяснению механизмов регуляции экспрессии. В работе наблюдалось, что гены в рамках одного оперона могут иметь разный уровень транскрипции, причём он может меняться в зависимости от условий. Гены, при этом, могут экспрессироваться и как один оперон, и как несколько независимых оперонов. Это явление получило название контекстной регуляции оперонов. Было также обнаружено 89 антисмысловых транскриптов. Здесь необходимо сделать оговорку относительно особенностей выбранного авторами организма. *M. pneumoniae* не может расти в суспензионной культуре, и поэтому культивируется только в прикрепленном состоянии на твёрдой подложке. В силу этого, при таком методе культивирования сложно добиться гомогенности и синхронности клеток. Это также усугубляется тем, что *M. pneumoniae* растёт несколько суток. В данной серии работ стандартный метод культивирования включал инкубацию 72 часа. Как было показано в настоящей работе, состояние клеток является критическим для наблюдения ответа на уровне транскрипции. Незначительная индукция генов ответа на тепловой стресс, зафиксированная в ряде работ может быть результатом состояния клеток, а не редукцией системы регуляции транскрипции.

Эта же группа исследователей проделала аналогичную работу по измерению представленности белков в соответствующих типах стресса [21]. Наблюдаемая амплитуда изменений, однако, была довольно небольшой. Как правило, изменения составляли порядка двух раз. В тепловом стрессе таким образом было зафиксировано 26 белков, изменяющих свои концентрации более чем в 1,5 раза. В осмотическом стрессе таких было 19, а при обработке митомицином 20 белков. Также из этих результатов следует, что большое количество изменений на уровне РНК слабо отражается на состоянии протеома.

Класс Молликут делится на несколько филогенетических ветвей. Они включают группу *Pneumonia*, группу *Hominis*, группу *Spiroplasma/Phytoplasma* и группу *Haemoplasma* [22] (Рисунок 2). В группу *Spiroplasma* входят патогены растений и насекомых, представители прочих групп преимущественно обитают в позвоночных животных.

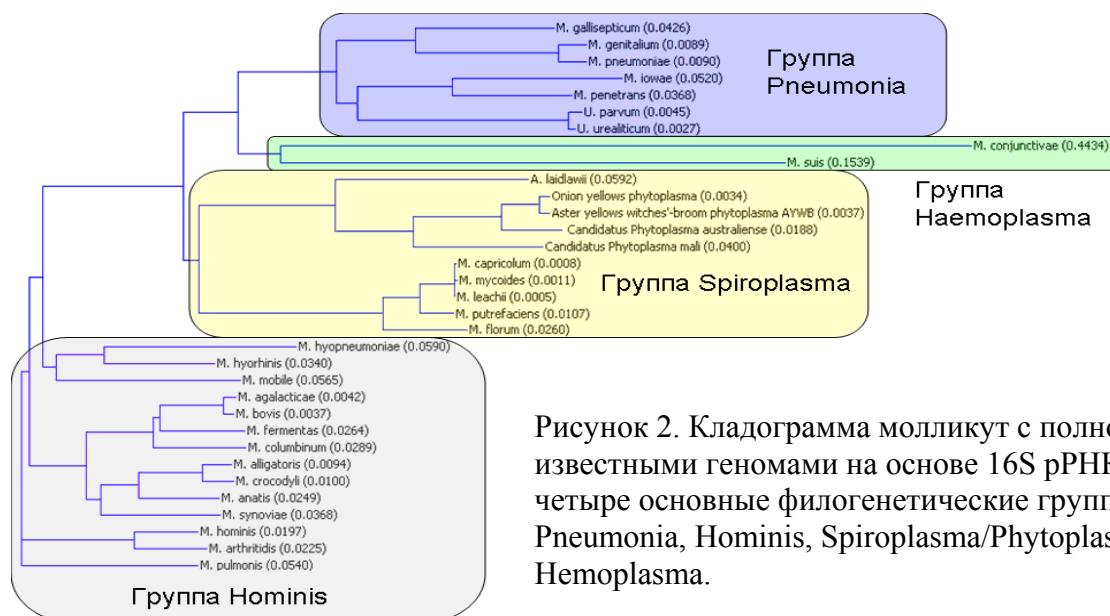


Рисунок 2. Кладограмма молликут с полностью известными геномами на основе 16S рРНК. Выделены четыре основные филогенетические группы: *Pneumonia*, *Hominis*, *Spiroplasma/Phytoplasma* и *Haemoplasma*.

Существует также «классическая» классификация класса молликут, в котором выделяется пять порядков: *Acholeplasmatales* [23], *Anaeroplasmatales* [24], *Entomoplasmatales* [25], *Haloplasmatales* [26] и *Mycoplasmatales* [25]. Порядок *Mycoplasmatales*, собственно «микоплазмы», при этом состоит из одного семейства *Mycoplasmataceae* и включает два рода: *Mycoplasma* и *Ureaplasma*. Эта классификация несколько не соответствует реальным филогенетическим взаимоотношениям внутри класса молликут. Например, представители рода *Ureaplasma* и *Mycoplasma genitalium*, как по последовательностям 16S и 23S рРНК, так и по ряду особенностей молекулярной биологии гораздо ближе друг другу, чем *Mycoplasma genitalium* к *Mycoplasma hominis*.

Mycoplasma gallisepticum, исследованная в данной работе – патоген птиц, принадлежит к группе *Pneumonia*. Она может заражать широкий репертуар хозяев, в том числе домашнюю птицу – кур и индюшек, а также диких птиц. У птиц *M. gallisepticum* колонизирует дыхательные пути, включая носовые ходы, трахеи, лёгкие и воздушные мешки. Этот микроорганизм является возбудителем

хронического респираторного заболевания у взрослых птиц и смертельно опасен для молодняка. В связи с этим, *Mycoplasma gallisepticum* имеет важное сельскохозяйственное значение. Ближайшими родственниками *Mycoplasma gallisepticum* являются бактерии *Mycoplasma pneumoniae* и *Mycoplasma genitalium*, а также представители рода *Ureaplasma*, которые являются патогенами человека. *Mycoplasma pneumoniae* вызывает атипичную пневмонию, а другие виды – урогенитальные инфекции. Также в группу Pneumonia входит *Mycoplasma penetrans*, для которой показана способность проникать внутрь клеток хозяина. В связи с этим *Mycoplasma gallisepticum* является удобной моделью для изучения микоплазм, патогенных для человека, при этом оставаясь неопасной для исследователя. Другое важное свойство *M. gallisepticum* – она может расти в суспензионной культуре, что существенно упрощает стандартизацию проводимых экспериментов. Кроме того, *M. gallisepticum* в суспензионной культуре растёт значительно быстрее других видов группы Pneumonia.

Несмотря на общую редукцию генома и наблюдаемую простоту организации, микоплазмы обладают высокими адаптивными возможностями [7] и способны, в частности, успешно противостоять антибиотикотерапии. Данные геномной аннотации микоплазм говорят в пользу существенно ограниченных адаптивных возможностей, с другой стороны, на практике микоплазмы демонстрируют развитые способности к адаптации. В связи с этим, исследование адаптации микоплазм к стрессу представляет как теоретический, так и практический интерес. Небольшой размер генома также делает микоплазму удобным объектом для системных исследований, так как организация различных метаболических систем таких клеток лучше поддаётся описанию вследствие небольшого числа компонентов.

Данная работа была посвящена исследованию механизма адаптации *Mycoplasma gallisepticum* к стрессовым условиям на модели окислительного, осмотического и теплового стресса. Было проведено детальное исследование ответа на тепловой стресс, который, как показало наше исследование, является наиболее физиологически важным для *M. gallisepticum*. Вследствие

паразитического образа жизни *M. gallisepticum* данные виды стресса являются для этой бактерии физиологическими, с которыми она сталкивается в результате ответа иммунной системы хозяина. В задачи данного исследования входило системное изучение всех уровней адаптации этого микроорганизма. Системный подход включал в себя секвенирование генома, создание биологических моделей стресса, транскриптомный анализ в различных стрессовых состояниях и протеомный анализ *M. gallisepticum* в тепловом стрессе. Транскрипционное профилирование также включало разметку функциональных единиц, включая промоторы, опероны и некодирующие РНК.

1.2. Цели и задачи

Цель настоящей работы – описать молекулярные события, происходящие в клетках *M. gallisepticum* при адаптации к стрессовым воздействиям.

В задачи настоящей работы входило:

- 1) Определение полной последовательности генома *M. gallisepticum* S6 для использования в качестве референсного в транскриптомных и протеомных исследованиях.
- 2) Создание биологических моделей стрессов.
- 3) Транскрипционное профилирование *M. gallisepticum* с использованием высокопроизводительного секвенирования в тепловом, окислительном и осмотическом стрессах, а также в логарифмической и стационарной фазах роста. Валидация полученных данных с помощью количественной ПЦР. Создание карты транскрипционных единиц *M. gallisepticum*.
- 4) Протеомное профилирование *M. gallisepticum* при адаптации к тепловому стрессе.

1.3. Обзор литературы

Молекулярные системы бактерий, участвующие в адаптации к стрессу

Репертуар адаптивных механизмов бактерий достаточно широк и разнообразен. В зависимости от типа стресса для защиты могут быть задействованы те или иные специфичные механизмы из имеющегося набора или их комбинации. В данной главе рассмотрены различные механизмы защиты от теплового, окислительного и осмотического стрессов. Основное внимание уделено механизмам, актуальным для молликут и, в частности, *M. gallisepticum*.

Комплекс DnaK-DnaJ-GrpE

Комплекс DnaK-DnaJ-GrpE узнаёт и связывает гидрофобные петли в белках, как новосинтезированных, так и повреждённых в результате стресса [27]. DnaJ играет роль рецептора, который связывает протяжённые гидрофобные полипептиды. После этого DnaJ в комплексе с полипептидом связывает DnaK и передаёт ему полипептид, причём процесс связывания DnaK с полипептидом является АТФ-зависимым. В результате образуется стабильный комплекс DnaK-полипептид, что, по-видимому, способствует дисагрегации белковых конгломератов и даёт возможность несвязанным участкам приобрести правильную укладку. GrpE (фактор нуклеотидного обмена) обеспечивает обмен АДФ на АТФ при работе DnaK и, таким образом, подготавливает его к следующему циклу работы.

Белки семейства DnaJ делятся на три подсемейства, собственно DnaJ, CbpA и Djl. В структуру DnaJ входят несколько доменов, включая J-домен, необходимый для функционирования в качестве шаперона, глицин/фенилаланин-

богатый регион, цинк-связывающий домен и С-терминальный домен. У белков подсемейства CbpA отсутствует цинк-связывающий домен, а у белков подсемейства Djl обнаруживается только J-домен. Djl является мембранным белком.

В геноме одного организма, например *E.coli*, одновременно могут присутствовать несколько гомологов DnaK и DnaJ. По-видимому, некоторые гомологи в большей степени обеспечивают фолдинг синтезируемых белков, в то время как другие специализируются на повреждённых белках. Разные гомологи DnaK и DnaJ имеют специфичность к своим партнёрам. Например DnaK *E. coli* может связывать DjiA, но не связывает DjlB и DjlC, партнёров HscC (гомолог DnaK). При этом не все белки семейства DnaK зависят от фактора обмена нуклеотидов. Возможно, разные белки семейства DnaJ обладают разной субстратной специфичностью. Показано, что HscB *E. coli* специфически связывает белок IscU. Для HscA и HscB показано участие в сборке FeS-кластеров. Белок CbpA обладает ДНК-связывающей активностью, и, как показано, является одним из основных белков нуклеоида *E. coli* в стационарной фазе.

В геноме *M. gallisepticum* представлены все компоненты обычной системы DnaK-DnaJ-GrpE. Также для *M. gallisepticum* и для всей филогенетической группы *Pneumonia* характерно присутствие нескольких гомологов *dnaJ*. Так у *M. pneumoniae* и *M. genitalium* присутствуют по три гомолога *dnaJ*, а у *M. gallisepticum* есть 6 полноразмерных генов и один разбит на несколько независимых открытых рамок считывания. Как будет рассмотрено в дальнейшем, один из гомологов *dnaJ* в *M. gallisepticum*, а именно *dnaJ_4* является, по-видимому, специализированным шапероном FeS-кластеров и является функциональным аналогом белков HscA и HscB *E. coli*.

Шапероны семейства GroE

Система шаперонов семейства GroE состоит из двух гептамерных комплексов GroEL и GroES. Функциональный белок является димером и включает по две субъединицы GroEL и GroES. Комплекс GroE представляет

собой полый цилиндр, внутрь которого попадают неправильно фолдированные полипептиды [28]. Механизм действия GroE, по-видимому, обеспечивает дефолдирование белков, кинетически заторможенных в неправильной конформации, и даёт им возможность принять правильную конформацию [29]. Процесс фолдинга с помощью GroE сопряжён с гидролизом АТФ. GroEL связывает дефолдированные и частично фолдированные белки у которых экспонированы наружу протяжённые гидрофобные участки. Происходит это за счёт того, что в полость внутри GroE изначально экспонированы его гидрофобные участки. Затем субъединицы GroES связывают АТФ. После этого происходят конформационные изменения, сопряжённые с гидролизом АТФ, в ходе которых изначально экспонированные внутрь полости гидрофобные участки GroE заменяются на гидрофильные. Этот процесс индуцирует погружение гидрофобных участков на поверхности фолдируемого белка внутрь и наоборот, перемещение гидрофильных участков наружу. Затем происходит освобождение белка и АДФ. Весь цикл работы GroE занимает около 15 секунд.

В отношении этой системы шаперонов *M. gallisepticum* ничем не отличается от других бактерий. Исключение составляет лишь то, что гены *groE* не находятся под контролем систем регуляции ответа на тепловой стресс.

Шапероны семейства Clp

Белки семейства Clp выполняют двоякую функцию. Некоторые из них осуществляют дисагрегацию и фолдинг белков, другие же являются протеазами. Белки Clp семейства формируют схожие структуры, представляющие из себя поры, образованные кольцом из нескольких субъединиц белка. В частности, ClpV образует гексамер [30], а ClpP димер из двух гептамеров (всего 14 субъединиц) [31]. Механизмы дисагрегации и фолдинга являются схожими. Clp-фолдаза связывает полипептид и протягивает его через пору. Этот процесс является АТФ-зависимым. При этом, с одной стороны, полипептид извлекается из белкового агрегата, если таковой образовался, с другой стороны, работа Clp-фолдазы имитирует выход полипептида через выходной канал рибосомы, давая ему тем

самым возможным сворачиваться таким же образом, как это происходит при нормальном синтезе белка. Clp-протеазы не обладают АТФазной активностью и в силу этого работают в комплексе с Clp-фолдазами. Первые при этом обеспечивают разворачивание полипептида и транслокацию его через пору протеазной субъединицы. Среди белков Clp семейства ClpВ работает как фолдаза. ClpА и ClpХ являются фолдазами, но работают в комплексе с протеазой ClpР [32].

M. gallisepticum обладает лишь одним белком семейства Clp. Это фолдаза (не протеаза) ClpВ. Этот белок является одним из мажорных при ответе на тепловой стресс (см. результаты) и, по-видимому, является ключевым для адаптации *M. gallisepticum* к стрессу. Он также является наиболее индуцируемым при ответе на тепловой стресс у других микоплазм группы *Pneumonia* – *M. pneumonia* и *M. genitalium*.

Шапероны семейства HslU/V

Белки HslU родственны белкам семейства Clp. Комплекс HslU-HslV представляет собой прокариотический аналог протеасомы и, по-видимому, в норме осуществляет утилизацию белков [33]. HslU аналогично ClpХ является АТФ-связывающей и полипептид-связывающей субъединицей, а HslV представляет собой протеазу. При этом для *E. coli* показано увеличение экспрессии соответствующих генов при тепловом стрессе. У *M. gallisepticum* белки этого семейства отсутствуют.

Протеазы семейства Lon (La)

Lon является АТФ-зависимой протеазой, строение которой аналогично строению белков Clp-семейства. Lon представляет собой гомогептамер кольцевой формы с центральной порой [34]. При этом Lon одновременно обладает АТФ-зависимой активностью, обеспечивающей транслокацию полипептида и протеазной активностью. Lon может самостоятельно узнавать повреждённые белки и подвергать их протеолизу. Помимо этого, Lon гидролизует некоторые короткие сигнальные белки. Кроме этого, для Lon показана шапероноподобная

активность, не связанная с протеазной активностью. Lon также может неспецифически связывать ДНК. В геноме *M. gallisepticum* есть единственный гомолог гена протеазы Lon.

Триггер-фактор Tig

Триггер-фактор – небольшой белок, связанный с рибосомой [35]. Несмотря на то, что для него не показано увеличение экспрессии в стрессовых условиях, он необходим для выживания клетки при стрессе. Его функция заключается в предотвращении агрегации полипептидных цепей, выходящих из рибосомы. В геноме *M. gallisepticum* ген триггер-фактора находится в одном опероне с геном *lon*, однако не индуцируется при тепловом стрессе и, в отличие от *lon*, не имеет регулятора CIRCE.

Шапероны семейства Ibp

В результате стресса в клетке могут образовываться белковые агрегаты и денатурированных белков, взаимодействующих своими гидрофобными сегментами [36]. Разборка таких агрегатов – задача белков Clp-семейства и системы DnaK-DnaJ-GrpE. При этом, однако этот процесс происходит намного эффективнее при участии белков семейства Ibp, связывающих денатурированные белки и предотвращающих или, как минимум, ослабляющих агрегацию. IbpA и IbpB работают в комплексе, облегчая доступ другим шаперонам. У *M. gallisepticum* эти белки отсутствуют, однако, присутствуют у других молликут, например, у *Acholeplasma laidlawii*.

Шапероны семейства HslO

Шапероны семейства HslO работают аналогично шаперонам семейства Ibp – они предотвращают агрегацию повреждённых белков [37]. Отличием HslO является то, что это специализированный шаперон, работающий в условиях окислительного стресса. Контроль активности HslO происходит на посттрансляционном уровне. Регулятором активности HslO является домен,

координирующий цинк за счёт остатков цистеина, которые могут окисляться и восстанавливаться. В нормальных условиях HslO находится в восстановленной форме и координирует цинк. При изменении Red/Ox потенциала среды в окислительную сторону цистеиновые остатки в регуляторном домене окисляются с образованием дисульфидных связей и потерей атома цинка. В результате HslO переходит в активную форму, связывающуюся с повреждёнными белками. Шапероны HslO отсутствуют у *M. gallisepticum*, но имеются у другого представителя класса молликут – *A. laidlawii*.

Шапероны FeS-кластеров

Функция соответствующих шаперонов заключается в сборке железо-серных (FeS) кластеров в составе различных белков. В сборке FeS кластеров участвуют как специализированные шапероны (Suf, Isc), так и гомологи DnaK-DnaJ системы. К последним относятся белки HscA и HscB [27]. Их задачей, по-видимому, является стабилизация специализированных FeS-шаперонов. Белки Suf организованы в сложный комплекс, который включает в себя субъединицы SufA, SufB, SufC, SufD, SufE и SufS. В данном комплексе ключевую роль играют белки SufA и SufS. SufS является цистеин-десульфуразой. Этот фермент переносит тиольную группу с L-цистеина на акцептор. SufE может служить акцептором для SufS, и, таким образом, усиливать его активность. SufA является FeS-шапероном. SufA может связывать железо и формирует FeS-кластер с использованием донора серы. Также SufA катализирует перенос сформированного FeS-кластера на акцепторный белок [38]. SufC является АТФазой, гомологичной АТФазным субъединицам ABC-транспортёров. Однако, SufC не имеет трансмембранных участков и показано, что этот белок взаимодействует с белками SufB и SufD [39]. Если SufA и SufC необходимы в норме для сборки FeS кластеров, то комплекс SufBCD вместе с другими Suf-белками необходим для защиты от перекисного стресса [40]. Также показано, что комплекс SufBCD необходим для извлечения железа из комплексов с сидерофорами.

В геноме *E. coli* есть несколько гомологичных систем, отвечающих за сборку FeS-кластеров. Это, помимо Suf-комплекса, белки IscA, IscU, IscS, а также CsdA. Из них IscA и IscU выполняют функции FeS-шаперонов, а IscS и CsdA являются цистеин-десульфуразами.

У *M. gallisepticum* соответствующие гены организованы в один оперон, который включает гены *sufC*, два гомолога *sufB*, ген цистеин-десульфуразы, *nifU* и один гомолог *dnaJ* (*dnaJ_4*), который, по-видимому, является функциональным аналогом *hscA* и *hscB* *E. coli*. Надо отметить, что ряд белков, участвующих в сборке FeS кластеров у других бактерий отсутствуют у *M. gallisepticum*.

Флаводоксины

Флаводоксины – небольшие белки, связывающие ФМН (флаavinмононуклеотид). Для флаводоксинов показана протекторная роль при окислительном стрессе, хотя их непосредственная функция неизвестна [41]. В геноме *M. gallisepticum* присутствуют два гомолога генов флаводоксинов.

Азоредуктазы

Азоредуктазы были изначально выделены и функционально охарактеризованы как ферменты, восстанавливающие азо- соединения до соответствующих аминов. Их роль в живой клетке остаётся во многом загадкой, однако недавние исследования позволяют пролить свет на их функцию. Азоредуктаза *E. coli* участвует в защите клетки от стресса, вызываемого электрофильными соединениями, такими как хиноны или диамид [42]. Хиноны способны образовывать аддукты с тиольными группами, что приводит к повреждению, например, белков, имеющих в составе остатки цистеина. В особенности это касается ферментов, чья каталитическая активность связана с циклическим окислением и восстановлением остатков цистеина в активном центре. Азоредуктаза восстанавливает хиноны до хинолов с помощью НАДН, удаляя таким образом потенциально опасные соединения. Участие азоредуктазы в ответе на иные формы стресса у *E. coli* и *B. subtilis* не показано, однако, показано,

что азоредуктаза защищает в клетке пул восстановленных тиолов, таких как глутатион. Можно предположить, что в окислительном стрессе азоредуктаза может защищать пул тиолов, таких как глутатион и тиоредоксин, а также защищать ферменты детоксификации активных форм кислорода, работа которых зависит от свободных SH-групп. В геноме *M. gallisepticum* присутствует один ген азоредуктазы.

Пероксиредоксины

Пероксиредоксины представляют собой широкий класс ферментов, восстанавливающих как органические, так и неорганические пероксиды до спиртов с помощью восстановительных эквивалентов НАДН или НАДФН. Наиболее изученными ферментами этого класса являются AhpC, Trx, Ohr и OsmC.

Пероксиредоксин AhpC обладает широкой субстратной специфичностью и активен как в отношении H_2O_2 , так и в отношении органических пероксидов, таких как пероксинитрит, тимин-гидропероксид или пероксид липоевой кислоты [43]. AhpC может существовать в форме гомодимера или в форме гомодекамера (фактически комплекса, состоящего из пяти димеров), причём декамерная форма обладает большей активностью. Предпочтительное образование той или другой формы зависит от Red/Ox потенциала и является механизмом регуляции активности этого фермента. Каталитический механизм AhpC зависит от двух остатков цистеина – каталитического и восстанавливающего. Димер AhpC организован по принципу «голова к хвосту», таким образом, что каталитический остаток цистеина одной субъединицы находится напротив восстанавливающего остатка другой субъединицы. Каталитический цикл AhpC начинается с того, что каталитический остаток цистеина реагирует с пероксидом с образованием соответствующего спирта или воды в случае H_2O_2 и остатка цистеин-сульфоновой кислоты (Cys-SOH). Затем цистеин-сульфоная кислота восстанавливается за счёт остатка восстанавливающего цистеина с образованием дисульфидной связи и воды. Замыкает каталитический цикл восстановление дисульфидной связи с

помощью той или иной восстанавливающей системы клетки. В качестве восстановителя может выступать тиоредоксин, либо специфическая оксидоредуктаза. При этом разные гомологи AhpC могут проявлять специфичность к определённым тиоредоксинам. Примером такого фермента может служить AhpF. Этот фермент гомологичен тиоредоксин-редуктазе и восстанавливает AhpC за счёт НАДН. Также существует редуктаза AhpD, которая восстанавливает AhpC за счёт НАДФН через посредство дигидролипоамид-дегидрогеназы и дигидролипоамид-ацетилтрансферазы.

Пероксиредоксин Trx имеет димерную структуру, аналогичную AhpC. Trx проявляет большую активность в отношении сложных органических пероксидов, нежели в отношении низкомолекулярных пероксидов и является более активным, чем AhpC. Донором восстановительных эквивалентов является тиоредоксин [44]. Trx может быть специфична в отношении того или иного тиоредоксина как и AhpC.

Белки Ohr и OsmC принадлежат к одному семейству и чаще встречаются у бактерий, ведущих паразитический образ жизни [45]. Пероксиредоксины этого семейства предпочтительно используют в качестве субстрата органические пероксиды и их активность по отношению к H_2O_2 невелика. Ohr/OsmC образуют димер, и механизм катализа аналогичен таковому у других пероксиредоксинов [46]. Однако каталитический центр Ohr/OsmC располагается целиком в пределах одной субъединицы. В отличие от других оксидоредуктаз, восстановление Ohr/OsmC *in vitro* обеспечивается дитиолами, такими как ДТТ или дигидролипоамид. При этом *in vivo* восстановитель остаётся неизвестным. Строение субстрат-связывающего участка Ohr/OsmC позволяет предположить, что его субстратами являются пероксиды липидов. В геноме *M. gallisepticum* есть два гомолога пероксиредоксинов OsmC.

Метионин-сульфоксид редуктазы

Метионин в составе белков является одной из наиболее уязвимых к окислению аминокислот. В результате воздействия активных форм кислорода или

азота метионин превращается в метионин-сульфоксид (Met-SO). Метионин-сульфоксид редуктазы катализируют обратную реакцию восстановления метионина. Существует два негомологичных семейства метионин-сульфоксид редуктаз – MsrA и MsrB, которые являются при этом стереоспецифичными к двум эписомам метионин-сульфоксида [47]. Механизм действия метионин-сульфоксид редуктаз аналогичен таковому у пероксиредоксинов. В катализе принимают участие два цистеиновых остатка – каталитический и восстанавливающий. Как и в случае пероксиредоксинов реакция идёт через образование цистеин-сульфоновой кислоты с последующим восстановлением с помощью восстанавливающего остатка цистеина. Восстановление метионин-сульфоксид редуктаз происходит с помощью тиоредоксина [48]. *M. gallisepticum* обладает белками обоих семейств метионин-сульфоксид редуктаз: MsrA и MsrB.

Каталаза и супероксид дисмутаза

Существует три группы каталаз, неродственных между собой – монофункциональные гем-содержащие каталазы, бифункциональные гем-содержащие каталазы-пероксидазы и марганец-содержащие каталазы [49]. Каталазы разлагают H_2O_2 на воду и O_2 . Каталазы-пероксидазы дополнительно способны осуществлять реакцию $\text{Донор} + H_2O_2 \rightarrow \text{Окисленный донор} + H_2O$, где в качестве донора может выступать органическое соединение.

Супероксид дисмутаза осуществляют реакцию $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Существует несколько групп супероксид дисмутаза, которые способны координировать различные ионы металлов [50]. В их число входят марганец, железо, цинк, медь и никель. Каталазы распространены среди бактерий, однако отсутствуют у *M. gallisepticum*.

Ферритиновые белки

Бактериальные ферритиновые белки объединяются одним общим свойством – способностью связывать железо. К ферритиновым белкам относятся белки FtnA – ферритин, Bfr – бактериоферритин и Dps. Ферритиновые белки состоят из как

минимум 12 субъединиц, которые образуют полый шарообразный комплекс. Полость внутри комплекса служит в качестве хранилища ионов железа. Внутри белка имеются каналы, соединяющие внутренний карман с поверхностью, через которые ионы железа могут попадать наружу или извлекаться в случае необходимости. Белки семейства Dps, как правило, имеют дополнительно лизин-богатые N-концевые участки. Связывание свободного железа и его депонирование является механизмом защиты от окислительного стресса, вызываемого действием гидроксил-радикала, который образуется в результате реакции Фентона ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$).

Белок Dps имеет двоякую функциональную активность. Помимо связывания железа, он может связывать ДНК, причём основной функцией Dps, по-видимому, является именно защита ДНК, а не депонирование железа [51]. Связывание ДНК происходит за счёт лизин-богатого участка на N-конце. Dps *in vitro* связывает как суперскрученную, так и релаксированную ДНК, а также РНК. Dps может связывать ДНК с образованием кристаллического комплекса, в котором додекамеры Dps формируют оболочку вокруг ДНК, что приводит к её конденсации и является эффективной защитой от повреждений любого типа. Комплекс Dps-ДНК отличается высокой стабильностью и может выдерживать нагревание до 100°C.

Белок Dps обладает феррооксидазной активностью, т.е. окисляет Fe^{2+} до Fe^{3+} . Всего на гексамер белка приходится 12 феррооксидазных активных центров. Окисление железа происходит за счёт H_2O_2 , хотя может менее эффективно происходить за счёт кислорода. Таким образом, Dps одновременно депонирует железо и разлагает H_2O_2 , защищая клетку от окислительного стресса.

В геноме *M. gallisepticum* есть два гомолога ферритиновых белков, причём один из них гомологичен ферритину и бактериоферритину, а другой – гомолог Dps.

Осморегулируемые каналы и транспортёры

Гиперосмотический и гипоосмотический стресс оказывают различное воздействие на клетку. Гипоосмотический стресс в первую очередь опасен повреждением клеточной мембраны. Гиперосмотический стресс приводит к потере воды цитоплазмой и, как следствие, как к нарушению структуры белков, так и к нарушению комплексообразования между макромолекулами. Также гиперосмотический стресс может приводить к нарушению мембранного транспорта. Механизмы защиты при этих видах стресса также отличаются, хотя и связаны с мембранным транспортом.

Защиту от гипоосмотического стресса обеспечивают механочувствительные каналы высокой проводимости (MSCL, Mechanosensitive Channel of Large Conductance). MSCL непосредственно воспринимают натяжение мембраны через специальные мембрано-связанные участки и открываются, если оно доходит до определённого предела.

Защита от гиперосмотического стресса связана с транспортом внутрь клетки соединений, обладающих осмопротекторными свойствами. Среди наиболее изученных транспортёров можно выделить белки ProP *E. coli*, BetP *Campylobacter glutamicum* и OpuA *B. subtilis* [52]. ProP обладает широкой субстратной специфичностью и может транспортировать как пролин, так и глицин бетаин. ProP является H^+ симпортом, BetP – Na^+ симпортом, а OpuA принадлежит к семейству ABC-транспортёров. BetP и OpuA специфичны только к бетаину. ProP, BetP и OpuA активируются в гиперосмотических условиях. Механизмы активации ProP, BetP и OpuA, по видимому, различны и не до конца выяснены. Все три транспортёра активируются ионами K^+ , Rb^+ и Cs^+ , но не Na^+ и Li^+ в экспериментах с протеолипосомами. BetP, по-видимому, является чувствительным к K^+ . В активации ProP также играют роль липиды мембраны. В геноме *M. gallisepticum* присутствует несколько генов ионных каналов, некоторые из которых плохо аннотированы. Из них есть как минимум один гомолог гена механочувствительного канала высокой проводимости *mscL*.

Потенциальные регуляторы в геноме *Mycoplasma gallisepticum*

Несмотря на достаточно богатый, по меркам редуцированной бактерии, репертуар защитных механизмов, немного известно об их регуляции. Регуляция работы белков может происходить на уровне транскрипции, на уровне трансляции и на уровне посттрансляционных модификаций. Отдельные элементы регуляторных систем бактерий, как правило, специализированы под определённый тип воздействия, причём регуляторы могут быть узкоспециализированы. Например, в случае окислительного стресса есть регуляторы чувствительные к $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и органическим пероксидам. В одной клетке может существовать целый набор регуляторных систем с частично пересекающимися функциями. Например, для *B. subtilis* известно не менее пяти систем регуляции ответа на тепловой стресс. Один вид стресса также может приводить к активации генов, участвующих в ответе на другой, при этом может использоваться один и тот же сигнальный механизм, например стрессовый сигма-фактор.

Несмотря на разнообразие регуляторных систем у бактерий вообще, набор известных систем регуляции экспрессии у молликут является крайне ограниченным. В геноме *M. gallisepticum* можно обнаружить ряд потенциальных транскрипционных факторов, ряд глобальных транскрипционных регуляторов, а также несколько протеин-киназ и фосфатаз. Как уже упоминалось выше, единственной регуляторной системой с полностью известным механизмом работы у *M. gallisepticum* является транскрипционный репрессор HrcA. Кроме него у *M. gallisepticum* присутствуют кандидатные транскрипционные факторы (ТФ), обнаруженные по наличию НТН-домена GCW_03283, GCW_01495, ТФ семейства GntR, два ТФ семейства Xre, гомолог Fur и ТФ семейства CrmB. Есть также нуклеоид-ассоциированный белок YbaB, функция которого не очень понятна, но может быть связана с регуляцией транскрипции. Также присутствуют глобальные транскрипционные регуляторы RpoE, SpxA, и кандидатный альтернативный сигма-фактор GCW_01185. Кроме этого, есть серин-треониновая

протеин-киназа PrkC и фосфатаза PrpC, а также бифункциональный белок серин/треониновая киназа-фосфофосфорилаза HprK.

Если рассмотреть распределение генов этих белков в геномах других молликут, то можно выявить несколько групп регуляторов на основании их представленности. В данном случае были рассмотрены только полностью собранные геномы молликут. В результате можно выделить универсальные регуляторы, которые есть у всех или почти у всех молликут в четырёх филогенетических группах. К ним относятся транскрипционные факторы HrcA и GCW_03283. Далее следует большая группа широко распространённых регуляторов, которые могут, однако, отсутствовать у некоторых филогенетических ветвей молликут. В эту группу можно отнести киназы и фосфатазы, ТФ'ы GCW_01495, гомологи Xre, GntR и Fur, а также глобальные регуляторы RpoE и SpxA. Альтернативный сигма-фактор GCW_01185 является специфичным для группы *Pneumonia*, а ТФ семейства CrmB – уникален для *M. gallisepticum*. Из этих данных видно, что большинство регуляторов так или иначе консервативны среди молликут, что позволяет сделать вывод об их важной функциональной роли. Отдельно нужно упомянуть о гуанозин-тетра (пента) фосфате, пути синтеза которого также распространены среди молликут, хотя и могут различаться у разных представителей.

Не все упомянутые регуляторы непосредственно задействованы в ответе на стресс у других бактерий. Однако, регуляторные пути часто пересекаются как в плане передачи сигнала, так и в плане эффекторных функций. Кроме того, системы регуляции отличаются большей пластичностью по сравнению с другими системами клетки, поэтому невозможно заранее определить, какие из регуляторов микоплазм управляют стрессовым ответом, а какие нет. Как будет показано далее эффекторные функции стрессового ответа у *M. gallisepticum* пересекаются, что, по-видимому, говорит скорее о наличии в клетке регуляторной сети, чем о наборе отдельных регуляторов. Далее будут более детально рассмотрены функции потенциальных регуляторов *M. gallisepticum* на основе данных, полученных для других микроорганизмов.

Альтернативные сигма-факторы

Альтернативные сигма-факторы являются распространённым механизмом глобального транскрипционного ответа на изменение факторов внешней среды. Как правило, бактерии имеют один основной или вегетативный сигма-фактор (σ^{70} , RpoD для *E. coli*, σ^A для *B. subtilis*) и некоторое количество сигма-факторов, специфичных к разным видам стресса или состояниям клетки. Альтернативные сигма-факторы переключают специфичность РНК-полимеразы с промоторов одного типа на промоторы другого типа. При этом экспрессия альтернативных сигма-факторов тоже должна каким-то образом регулироваться. Один и тот же сигма-фактор может участвовать в ответе на несколько типов стресса.

У *E. coli* описаны 7 сигма-факторов (1 основной σ^{70}), из них с ответом на стресс связаны три – σ^{32} , σ^E , и σ^S . σ^{32} участвует в ответе на тепловой стресс, σ^S активируется в стрессе, связанном с голоданием и низким pH, а σ^E задействован в ответе на стресс, связанный с повреждением клеточной стенки [53].

Экспрессия σ^{32} регулируется на уровне трансляции. В соответствующей мРНК в 5'-нетранслируемой области присутствует шпилька, которая закрывает сайт связывания рибосомы. Шпилька является термосенсором и при повышении температуры до 42°C плавится, открывая доступ к сайту связывания рибосомы. При этом активность σ^{32} модулируется шаперонами. Показано, что комплексы шаперонов DnaK-J и GroEL-ES могут выступать в роли анти-сигма факторов, связывая σ^{32} . При этом репрессия зависит от соотношения между нативными и денатурированными белками в клетке. Если денатурированных белков много, шапероны связываются в первую очередь с ними, когда же их количество снижается, шапероны связывают σ^{32} , что также является одним из механизмов репрессии ответа на тепловой стресс после его окончания. В то же время модуляция σ^{32} шаперонами не исчерпывается простым связыванием, хотя механизм такого эффекта остаётся невыясненным.

Сигма-фактор σ^S опосредует ответ на неблагоприятные факторы среды включая истощение питательных веществ, кислый pH, окислительный стресс,

низкую температуру и высокую осмолярность. В силу это σ^S активируется в том числе и в стационарной фазе. Его экспрессия на уровне транскрипции контролируется низкомолекулярными соединениями, включая ppGpp и cAMP. Помимо этого σ^S также регулируется на уровне трансляции при помощи шпильки в мРНК, аналогично σ^{32} . При этом шпилька в условиях низкой температуры или высокой осмолярности меняет конформацию с освобождением сайта связывания рибосомы. Также доступ к сайту связывания рибосомы открывается белком DsrA, который является сенсором низкой температуры.

Белок σ^E принадлежит к семейству ECF (Extra Cytoplasmic Function) сигма-факторов. ECF сигма-факторы, как правило, регулируются анти-сигма фактором, который является мембранным белком с двумя доменами. Цитоплазматический домен связывает сигма-фактор, а наружный воспринимает активирующий сигнал. При этом, сигма анти-сигма фактор может подвергаться протеолизу для освобождения сигма-фактора. Активность σ^E ингибируется анти-сигма фактором RsiA. При стрессе, связанном с повреждением клеточной стенки, RsiA подвергается протеолизу в двух сайтах протеазами RseP и DegS. Одним из факторов, запускающих деградацию RseA, является накопление неправильно фолдированных белков в периплазме [54].

Для *B. subtilis* описаны 12 сигма-факторов (1 основной и 11 альтернативных). Из них σ^B активируется в разных стрессовых состояниях, σ^C и σ^H отвечают за экспрессию генов в стационарной фазе, σ^D и σ^L контролируют экспрессию специфических генов. Белки σ^E , σ^F , σ^G , и σ^K работают при споруляции. Сигма-факторы σ^V , и σ^W принадлежат к семейству ECF сигма-факторов [55]. Сигма факторы σ^V , и σ^W регулируются, соответственно анти-сигма факторами RsiV и RsiW. Стресс, вызванный воздействием лизоцима, активирует σ^V . Это достигается в результате протеолиза анти-сигма фактора RsiV неизвестной протеазой. RsiW является чувствительным к стрессу, действующему на клеточную стенку осмотическому стрессу и действию антибиотиков, а также к щелочному стрессу.

Наиболее изученным альтернативным сигма-фактором *B. subtilis* является σ^B . Его активность регулируется анти-сигма фактором RsbW. При этом, альтернативный сигма-фактор участвует не только в ответе на тепловой стресс, но и во множестве других стрессов, таких как голодание, кислотный и осмотический стресс. Активность анти-сигма фактора RsbW определяется его взаимодействием с партнёром RsbV. Активность RsbV определяется его фосфорилированием, которое является результатом действия RsbW, который имеет также киназную активность и RsbU или RsbP, которые являются фосфатазами. Дефосфорилированный RsbV связывает RsbW, таким образом снимая репрессию с σ^B . RsbU и RsbP являются компонентами сенсорных систем, отвечающих за восприятие энергетического стресса, вызванного голоданием (RsbP) или стресса, вызванного факторами окружающей среды (RsbU). В последнее время было показано, что у ряда бактерий, например *B. subtilis* и *Moorella thermoacetica* присутствуют специальные органеллы – стрессосомы, которые участвуют в восприятии стресса и передаче его на эффекторы [56]. Стрессосома включает субъединицы RsbS, RsbR, RsbT и RsbX. Белки RsbR имеют два домена – наружный вариабельный N-концевой домен, который играет роль сенсора и домен STAS (Sulfate Transport and Anti-anti-Sigma factor). Белок RsbS играет структурную роль – формирует скаффолд стрессосомы связывая её субъединицы. RsbT является киназой, которая фосфорилирует RsbS, RsbR и RsbU – активатор σ^B . RsbX имеет фосфатазную активность. Стрессосома *Moorella thermoacetica* регулирует продукцию низкомолекулярного мессенджера – циклического дигуанилата.

RpoE – модулятор РНК-полимеразы

RpoE – дополнительная субъединица РНК-полимеразы (δ), распространённая среди Грамм-положительных бактерий [57]. Последовательность RpoE обладает гомологией с сигма-фактором. Дельта-субъединица оказывает двоякое действие на РНК-полимеразу *in vitro*. Во-первых, она ускоряет рециклизацию кор-фермента. Во-вторых, RpoE дестабилизирует

образование открытого комплекса, тем самым снижая сродство РНК-полимеразы к слабым промоторам. RpoE *in vivo* работает в качестве глобального регулятора, в том числе, в условиях стресса [58].

Система CIRCE-HrcA

Система CIRCE-HrcA распространена среди бактерий. В частности, она характерна для грамм-положительных бактерий, таких как *B. subtilis*. Эта система регуляции включает в себя транскрипционный репрессор HrcA и его сайт связывания CIRCE (controlling inverted repeat of chaperone expression). HrcA имеет обычный для транскрипционных репрессоров HTH (helix-turn-helix) мотив. CIRCE состоит из трёх элементов. Два концевых элемента длиной 9 п.н. представляют собой инвертированный повтор. Центральный участок имеет в длину также 9 п.н., при этом последовательность для узнавания не важна. CIRCE консервативен среди различных филогенетических групп бактерии и имеет консенсус **TTAGCACTCNNNNNNNNNGAGTGCTAA**. Вследствие такой организации CIRCE может образовывать шпильчатую структуру в геномной ДНК. Было показано, что в комплексе с HrcA CIRCE находится именно в такой конформации, при этом HrcA связывается в виде димера [59]. В отсутствие теплового стресса HrcA связывает CIRCE и, таким образом, репрессирует транскрипцию генов, в промоторах которых находится CIRCE. Сам по себе HrcA является нестабильным белком и легко теряет конформацию, в результате чего диссоциирует от CIRCE. В норме функциональная активность HrcA постоянно восстанавливается комплексом шаперонов GroEL-ES. При повышении температуры в клетке накапливаются денатурированные белки, которые начинают конкурировать с HrcA за шапероны GroEL-ES. Это приводит к смещению равновесия между нативной и денатурированной формой HrcA в сторону денатурированной формы, вследствие чего количество HrcA, способных связать CIRCE падает и репрессия соответствующих генов снижается. У многих бактерий ген *hrcA* стоит в опероне, который регулируется HrcA, что обеспечивает авторепрессию ответа на тепловой стресс.

Система регуляции CIRCE-HrcA является единственной системой регуляции ответа на стресс с известным механизмом работы у *M. gallisepticum* и большинства других молликут [60].

Регуляторы суперсемейства Fur

Белки суперсемейства Fur обладают широким функционалом. Они могут быть репрессорами, так и активаторами транскрипции. Большинство белков Fur-суперсемейства регулируется ионами металлов, но некоторые, регулируются H_2O_2 . Белки Fur являются регуляторами, поддерживающими гомеостаз метаболизма железа, а также могут играть роль глобальных регуляторов [61]. Белки суперсемейства Fur имеют два металл-связывающих участка – структурный и регуляторный. Структурный участок связывает ион цинка Zn^{2+} . Регуляторный, как правило, связывает ионы железа Fe^{2+} , но также может связывать ионы кобальта, никеля, цинка и марганца [62]. Сайт связывания разных гомологов Fur существенно отличается, хотя можно выделить достаточно консервативный минимальный сайт узнавания. В *E. coli* Fur связывает инвертированный повтор GATAATGATAATCATTATC. В *B. subtilis* Fur узнаёт палиндром TGATAATNATTATCA [63]. Классический механизм репрессии с помощью Fur работает следующим образом. Fur связывает ионы железа, когда их накапливается некоторое количество в цитоплазме, димеризуется и, затем, связывает свой сайт в промоторах генов, обеспечивающих транспорт железа в клетку. Впоследствии было показано, что механизм связывания Fur с ДНК сложнее и он может узнавать серии как прямых так и обратных повторов из минимальных сайтов связывания. Анализ различных сайтов связывания Fur показал, что минимальной единицей связывания является последовательность GATAAT [63]. При этом несколько димеров Fur могут кооперативно связываться с ДНК с образованием протяжённых комплексов.

Помимо функции репрессора, Fur может играть роль активатора транскрипции. Для ряда микроорганизмов показана прямая активация транскрипции с помощью Fur как *in vitro* так и *in vivo* [61].

Существуют другие члены суперсемейства Fur, специализированные для узнавания других ионов металлов. В их число входят Zur – сенсор цинка, Mur – сенсор марганца и Nur – сенсор никеля. Они регулируют гены, связанные с транспортом соответствующих ионов в клетку [61].

PerR – белок Fur-суперсемейства и специализированный сенсор H_2O_2 . В *B. subtilis* он связывает последовательность ТАТААТНАТТААА, которая может перекрываться с промотором. Связывание происходит в виде димера. PerR координирует ион цинка, который выполняет структурную функцию и ион железа, который выполняет регуляторную функцию. Таким образом, PerR также является сенсором железа. В норме железо в регуляторном сайте находится в форме Fe^{2+} . При появлении перекиси железо окисляется в Fe^{3+} в реакции Фентона, что приводит к окислению регуляторного остатка гистидина до 2-оксогистидина. В результате репрессор инактивируется и освобождает промотор [64].

Глобальный низкомолекулярный регулятор (алармон) ppGpp

В настоящее время известно большое количество производных нуклеотидов, выполняющих сигнальные функции. Из них для *M. gallisepticum* является актуальным только гуанозин-тетрафосфат (ppGpp), фермент синтеза которого (SpoT) закодирован в геноме.

Гуанозин-тетрафосфат (-пентафосфат), (p)ppGpp – глобальный регулятор транскрипционного ответа на стресс, связанный, прежде всего, с голоданием (также эти соединения носят название алармоны). Данные соединения распространены как среди грамм-положительных, так и среди грамм-отрицательных бактерий. При этом, механизм их влияния на транскрипцию отличается. У грамм-отрицательных бактерий (*E. coli*) (p)ppGpp взаимодействует с РНК-полимеразой с помощью белка DksA и этот комплекс оказывает прямое влияние на транскрипцию [65]. В грамм-положительных бактериях (*B. subtilis*) DksA отсутствует и механизм регуляции транскрипции не прямой [66].

Существует три родственных семейства белков, синтезирующих (p)ppGpp. Это белок RelA, обладающий только (p)ppGpp-синтазной активностью, SpoT,

обладающий как синтазной, так и гидролазной активностью и Rsh, который совмещает домены, гомологичные как первому, так и второму белку [67]. Rsh встречается только у фирмикут.

В *E. coli* связывание комплекса (p)ppGpp-DksA с РНК-полимеразой приводит к дестабилизации открытого комплекса. Это в свою очередь вызывает снижение транскрипции с промоторов, для которых образование открытого комплекса является лимитирующей стадией инициации транскрипции. К таким промоторам относятся промоторы рибосомальной РНК. Генетической детерминантой таких промоторов является дискриминатор (Dis элемент) – G-богатая последовательность между -10 боксом и точкой инициации транскрипции. При этом (p)ppGpp-DksA не влияет на промоторы, активность которых лимитируется связыванием полимеразы [65].

В *E. coli* (p)ppGpp является сигналом голодания по аминокислотам. Сигналом к синтезу (p)ppGpp является накопление неаминоацилированных тРНК. Его сенсором является ассоциированный с рибосомой белок RelA. SpoT *E. coli* может взаимодействовать с белком-переносчиком жирных кислот АСР, и, таким образом, участвует в регуляции ответа на голодание по жирным кислотам [65].

У *B. subtilis* регуляция транскрипции с помощью (p)ppGpp происходит косвенным путём. Во-первых, синтез (p)ppGpp может приводить к истощению пула ГТФ. При этом, для инициации транскрипции ключевое значение имеет концентрация иницирующего трифосфата. Снижение концентрации ГТФ приводит к снижению частоты инициации с промоторов, где первым нуклеотидом транскрипта является гуанозин-трифосфат. Также (p)ppGpp ингибирует инозин-монофосфат дегидрогеназу – фермент пути синтеза гуанозина [66].

Глобальный модулятор РНК-полимеразы SpxA

Белок SpxA является глобальным регулятором и функционирует как модулятор процесса связывания РНК-полимеразы с промотором. SpxA связывается с С-терминальным доменом α -субъединицы РНК-полимеразы и ингибирует связывание активаторов транскрипции. Показано, что у *B. subtilis*

SpxA участвует в регуляции ответа на окислительный стресс, вызванный паракватом [68]. В геноме *M. gallisepticum* присутствует один гомолог гена *spxA*.

Регуляция транскрипции с помощью суперспирализации ДНК

Одним из принципов глобальной регуляции транскрипции является регуляция на уровне суперспирализации ДНК. В норме ДНК бактерий находится в состоянии отрицательной суперспирализации. Она является результатом динамического равновесия между системами, вносящими отрицательные супервитки и положительные супервитки. К первым относятся ДНК-гиразы, ко вторым – ДНК топоизомераза I и белок HU. Отрицательная суперскрученность вносит напряжение в ДНК, способствующее плавлению цепей. Кроме этого отрицательная суперскрученность способствует выпетливанию и образованию шпилечных структур [69].

Таким образом, можно выделить два механизма регуляции транскрипции с помощью суперскрученности ДНК. Первый основан на том, что разные промоторы по-разному чувствительны к суперскрученности. Как правило, слабые промоторы в большей степени зависимы от отрицательной суперскрученности. Эта зависимость обусловлена тем, что РНК-полимеразе требуется локально расплавить ДНК в области промотора, чему дополнительно способствуют напряжения, вызванные суперскрученностью. Для неоптимального промотора энергетический барьер плавления ДНК выше, чем для оптимального и при снижении суперспирализации он становится непреодолимым [70].

Альтернативный механизм регуляции транскрипции основан на выпетливании шпилечной структуры в области промотора [71]. Это, наоборот, приводит к увеличению транскрипции при падении суперспирализации.

Роль вторичных структур РНК в регуляции экспрессии на уровне трансляции

Как было отмечено выше, регуляция экспрессии генов при тепловом стрессе может происходить не только на уровне транскрипции, но и на уровне трансляции. При этом, регуляторами являются вторичные структуры в

соответствующих мРНК. ROSE-элементы (Repression Of Heat Shock Gene Expression) были обнаружены в бактериях родов *Bradiirhizobium*, *Rhizobium* and *Mesorhizobium* [72]. Они управляют экспрессией альтернативного сигма-фактора и ряда белков теплового шока. ROSE-элементы представляют собой шпильку с двцепочечной областью длиной порядка 17 п.о. с небольшим неспаренным участком в центре и выпетливанием G в области последовательности Шайна-Дальгарно. Неспаренные области снижают стабильность шпильки таким образом, чтобы её плавление происходило в диапазоне температур, физиологичном для данного организма. Последовательность Шайна-Дальгарно и старт-кодон входят в состав шпильки и недоступны для рибосомы. При повышении температуры шпилька плавится, открывая доступ для рибосомы. FourU-элемент был обнаружен у сальмонелл, и принцип его работы аналогичен таковому у ROSE-элемента [73]. В отличие от ROSE-элемента, дестабилизация FourU-элемента обеспечивается трактом из 4 U оснований в середине шпильки.

Механизмы регуляции стрессового ответа у других бактерий

Гены регуляторов далеко не всех типов найдены в геноме *M. gallisepticum*. Так полностью отсутствуют регуляторы ответа на окислительный стресс и на повреждение ДНК (SOS-ответ), несмотря на их широкое распространение среди других бактерий. При этом далеко не все белки *M. gallisepticum* имеют известную функцию, а из 9 кандидатных ТФ только 2 имеют известную функцию – HrcA и Fug. Поэтому, возможно, соответствующие регуляторы находятся среди тех, функция которых пока не определена. Далее рассмотрены механизмы работы наиболее распространённых семейств ТФ, управляющих ответом на тепловой и окислительный стрессы.

Регуляторы и сенсоры теплового стресса

HspR – транскрипционный репрессор, связывающий инвертированный повтор HAIR (HspR-associated inverted repeat) **CTTGAGTNNNNNNNACTCAAG** в промоторах шаперонов. Этот регулятор является аналогом HrcA в стрептомицетах и микобактериях, также найден в бактериях рода *Helicobacter* и *Deinococcus*. Механизм температурной чувствительности этого транскрипционного фактора остаётся неизученным [74].

CtsR является транскрипционным репрессором с НТН-мотивом и связывает свой сайт в виде димера. CtsR связывает семнадцатичленную последовательность, имеющую прямые повторы на концах **AGTCAAANANAGTCAAA**. Репрессор, по-видимому, имеет собственный температурно-чувствительный глицин-богатый домен, благодаря которому инактивируется при нагревании [75].

Индукция экспрессии шаперона HtpG у *B. subtilis* обусловлена действием неизвестного транскрипционного регулятора. При этом показано, что для его связывания важна последовательность **GAAAGG**, расположенная сразу после промотора [75].

Регуляция транскрипции мембранных протеаз HtrA и HtrB, участвующих в ответе на тепловой стресс у *B. subtilis* зависит от наличия нескольких прямых повторов с последовательностью **TTTTCATATA** в промоторе. Механизм работы данной системы регуляции в значительной степени остаётся неизученным. Предположительно он связан с двухкомпонентной системой CsrRS, которая отслеживает состояние фолдинга белков, экспонированных на мембране [75].

Регуляторы и сенсоры окислительного стресса

Транскрипционный фактор OxyR является одним из главных регуляторов ответа на окислительный стресс. OxyR является одновременно транскрипционным активатором и транскрипционным репрессором. Он принадлежит к семейству регуляторов LysR, большинство из которых регулирует экспрессию генов метаболических ферментов. Представители этого семейства, как правило, связывают индуктор, который является метаболитом регулируемого метаболического пути. Вместо этого OxyR является сенсором внутриклеточного

Red/Ox потенциала и в неактивном восстановленном состоянии работает как транскрипционный репрессор. В *E. coli* OxyR узнаёт мотив ATAGN₁₀ATAGN₁₀ATAGN₁₀ATAG, а в микобактериях он связывается с инвертированным повтором ATC-N₉-GAT. Активации OxyR происходит через окисление регуляторного остатка цистеина. При этом может происходить образование дисульфидной связи. Некоторые гомологи OxyR активируются только окислением регуляторного остатка цистеина. В активированном состоянии OxyR активирует транскрипцию путём прямого взаимодействия с РНК-полимеразой. В отсутствие окислительного стресса OxyR восстанавливается и инактивируется с помощью глутатиона и глутаредоксина [64].

OhrR – другой важный участник регуляции ответа на окислительный стресс. Он является транскрипционным репрессором и сенсором органических пероксидов. Белки OhrR можно разделить на два семейства – с одним регуляторным остатком цистеина и содержащие два и более регуляторных остатка. Механизм работы OhrR основан на окислении регуляторных остатков цистеина органическими гидропероксидами. При этом у белков с одним регуляторным остатком происходит окисление до сульфоновой кислоты, а у белков с несколькими регуляторными остатками образуются межмолекулярные дисульфидные связи внутри димера OhrR [76].

HypR регулятор обнаружен в геноме *B. subtilis*. Этот белок является активатором транскрипции и сенсором гипохлорита. Механизм активации HypR основан на окислении регуляторных остатков цистеина с образованием межмолекулярной дисульфидной связи и димеризации белка [76].

SoxR является специфическим регулятором ответа на стресс, вызванный супероксид-анионом и оксидом азота. SoxR содержит два Fe-S кластера, которые выполняют роль сенсора. При наличии супероксид-аниона Fe-S кластеры подвергаются окислению, активируя ДНК-связывающую активность белка. SoxR является транскрипционным активатором, причём для его работы необходимо определённое положение сайта связывания относительно промотора, в противном случае он действует как репрессор [77].

Адаптивные механизмы Mycoplasma gallisepticum

Основываясь на вышеописанных известных механизмах адаптации к стрессу и последовательности генома *M. gallisepticum* можно сделать выводы относительно механизмов стрессовой защиты и их регуляции у этой бактерии. *M. gallisepticum* имеет достаточно широкий репертуар шаперонов, в который входит большая часть белков данного типа. Эти белки перекрывают почти весь спектр функций, необходимых для восстановления фолдинга белков. Исключение составляют системы защиты от агрегации белков, которые широко представлены у других бактерий. У *M. gallisepticum* эту функцию может выполнять только комплекс DnaK-DnaJ-GrpE. Также у *M. gallisepticum* присутствует только одна протеаза, участвующая в утилизации повреждённых белков. У генов шаперонов *M. gallisepticum* также присутствует регуляторный элемент – CIRCE и соответствующий транскрипционный фактор HrcA. В результате можно сделать вывод, что система шаперонов *M. gallisepticum* хотя и редуцирована, но в ней присутствует необходимый и достаточный репертуар функций и регуляторных событий для полноценной работы.

Системы защиты от окислительного стресса *M. gallisepticum* довольно разнообразны, но имеют ряд особенностей. Наиболее примечательно отсутствие каталаз и супероксид-дисмутаз, которые характерны для большинства бактерий. По-видимому, эту функцию выполняют пероксиредоксины, которых у *M. gallisepticum* присутствует два. У *M. gallisepticum* присутствует комплекс FeS-шаперонов, хотя в нём меньше компонентов, чем в аналогичной системе *E. coli*. С точки зрения функции в нём присутствуют белки, непосредственно участвующие в формировании FeS-кластеров, в том числе специализированный гомолог DnaJ и отсутствуют структурные белки, функцию которых, возможно, выполняют негомологичные белки. У *M. gallisepticum* также присутствует полный набор

метионин-сульфоксид редуктаз, два гомолога тиоредоксина и тиоредоксин-редуктазы.

У *M. gallisepticum* присутствуют ферритиновые белки, в том числе белок Dps, участвующий в неспецифической защите ДНК и имеющий феррооксидазную активность. Таким образом, *M. gallisepticum* имеет системы защиты от окислительного стресса, вызываемого ионами переходных металлов, в частности, железа. Помимо этого у *M. gallisepticum* есть малоизученные белки, участвующие в защите от окислительного стресса – азоредуктаза и флаводоксин. Если репертуар защиты от окислительного стресса у *M. gallisepticum* достаточно богатый, то о регуляции ответа на соответствующий стресс ничего не известно. У *M. gallisepticum* есть гомолог транскрипционного фактора Fur, однако сайт связывания его неизвестен и не обнаруживается напрямую по гомологии с известными сайтами других белков этого семейства.

Из механизмов защиты от осмотического стресса у *M. gallisepticum* есть только механочувствительный канал высокой проводимости, участвующий в ответе на гипоосмотический стресс. Механизмы ответа на гиперосмотический стресс *M. gallisepticum* неизвестны.

Также у *M. gallisepticum* обнаруживается ряд регуляторных механизмов, для которых приписать функцию пока не удаётся. В эту группу входит пять аннотированных нами транскрипционных факторов, две системы киназ-фосфатаз, а также ряд глобальных регуляторов. При этом бросается в глаза относительно большое количество глобальных регуляторов по сравнению с транскрипционными факторами. Из глобальных регуляторов у *M. gallisepticum* присутствуют RpoE, SpxA, алармон ppGpp и кандидатный альтернативный сигма-фактор. Их мишени и механизмы активации, равно как и состояния, в которых они работают, не изучены.

2. Материалы и методы

2.1. Культуральные работы

Культивирование M. gallisepticum

Штамм *Mycoplasma gallisepticum* S6 культивировался в жидкой среде, содержащей 20 г/л триптозы, 5 г/л NaCl, 1,3 г/л KCl, 3 г/л Трис, 5% дрожжевого диализата, 10% сыворотки крови лошади, 1% глюкозы, 1000 ед/мл пенициллина, рН=7,4. Для выделения колоний культивирование проводилось в полужидкой среде, по составу аналогичной предыдущей с добавлением 0,4% агара. Среда стерилизовалась автоклавированием (20 мин при 1,2 атм) до добавления сыворотки, глюкозы и дрожжевого диализата. Культивирование проводилось при 37°C в аэробных условиях. Для посева использовалось требуемое разведение из расчёта 4 часа на одно деление (см. Результаты).

Определение кинетики роста культуры M. gallisepticum

Аликвоты культуры *M. gallisepticum* отбирались через определённые промежутки времени (3 часа) и использовались для выделения ДНК и РНК. Затем измерялась кинетика накопления ДНК и РНК в культуре клеток с помощью количественной ПЦР в реальном времени (Рисунок 3). Для проведения ПЦР использовались праймеры на 16S и 23S рРНК. Методика описана в публикации [78].

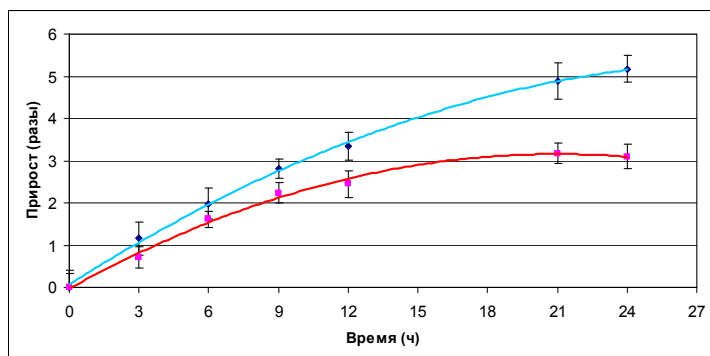


Рисунок 3. Кинетика роста культуры *M. gallisepticum* методом количественной ПЦР. Красным обозначен прирост рРНК, синим – прирост геномной ДНК.

Подбор условий стрессовых и ингибиторных воздействий

Аликвоты клеток *M. gallisepticum* подвергались различным дозам воздействия с определённым шагом. Например, для теплового стресса шаг дозы воздействия составлял 1°C, для антибиотиков – 1 мкг/мл, для соли 0,1 М. После воздействия определялся титр жизнеспособных клеток с помощью цветового теста. Также для теплового стресса проводился высеv на колонии в полужидкую среду. В качестве рабочей дозы воздействия выбиралась наибольшая, при которой ещё сохранялся исходный титр клеток (сублетальные дозы). Стандартным временем воздействия для определения дозы воздействия был 1 час. Методика описана в публикации [78].

2.2. Приготовление препаратов ДНК, РНК, белка

Выделение ДНК

Клетки осаждались центрифугированием 10 мин. при 8000 g. Клетки лизировались в растворе, содержащем 20 г/л бромида цетил-триметиламмония, 81,8 г/л NaCl, 1М Трис, 0,5М ЭДТА. Лизис проводился в следующем соотношении: 500 мкл лизирующего раствора на осадок с 1 мл клеточной культуры. Затем лизирующий раствор инкубировался на 60°C 10 мин. Затем к раствору добавлялся равный объём хлороформа и смесь интенсивно перемешивалась с образованием эмульсии. Затем проводилось

центрифугирование 15 мин. при 16000 g, в результате чего происходило разделение фаз на водную и органическую. Водная фаза (500 мкл) переносилась в новую пробирку с добавлением равного объёма изопропанола. Смесь инкубировалась при -20°C ночь или 15 мин. при -75°C. Для дальнейшей работы как правило отбиралась аликвота в 500 мкл. Затем смесь центрифугировалась 20 мин. при 16000 g. Супернатант отбирался, и в пробирку добавлялось 100 мкл 80% этанола. Затем проводилось центрифугирование 5 мин. при 16000 g. Супернатант отбирался, и осадок растворялся в 20 мкл воды. Концентрация ДНК измерялась с помощью спектрофотометра NanoDrop или флуориметра Qubit (Invitrogen) и набора для измерения концентрации ДНК (Invitrogen).

Выделение РНК для проведения ПЦР

Клетки напрямую лизировались с помощью реагента Trizol LS (Invitrogen) в соотношении 1:3 клетки:Trizol LS. Как правило, бралось 300 мкл суспензии клеток на 900 мкл Trizol LS. К смеси добавлялось 240 мкл хлороформа и смесь интенсивно перемешивалась с образованием эмульсии. Затем проводилось центрифугирование 15 мин. при 16000 g, в результате чего происходило разделение фаз на водную и органическую. Водная фаза (600 мкл) переносилась в новую пробирку с добавлением равного объёма изопропанола. Смесь инкубировалась при -20°C ночь или 15 мин. при -75°C. Для дальнейшей работы как правило отбиралась аликвота в 300 мкл. Затем смесь центрифугировалась 20 мин. при 16000 g. Супернатант отбирался, и в пробирку добавлялось 100 мкл 80% этанола. Затем проводилось центрифугирование 5 мин. при 16000 g. Супернатант отбирался, и осадок растворялся в 10 мкл воды (Panreac).

Выделение РНК для высокопроизводительного секвенирования

Клетки напрямую лизировались с помощью реагента Trizol LS (Invitrogen) в соотношении 1:3 клетки:Trizol LS. Как правило, бралось 300 мкл суспензии клеток на 900 мкл Trizol LS. К смеси добавлялось 240 мкл хлороформа и смесь интенсивно перемешивалась с образованием эмульсии. Затем проводилось

центрифугирование 15 мин. при 16000 g, в результате чего происходило разделение фаз на водную и органическую. Водная фаза (600 мкл) переносилась в новую пробирку с добавлением равного объёма 70% этанола. Смесь наносилась на колонку PureLink (Invitrogen). Образцы центрифугировались 1 мин при 16000 g. Колонка промывалась 500 мкл промывочного буфера центрифугированием 1 мин при 16000 g. Элюат отбирался и колонка центрифугировалась 2 мин. при 16000g для полного удаления промывочного буфера. РНК элюировалась с колонки в новую пробирку 10 мкл воды (RanGeac) центрифугированием 1 мин при 16000 g. Концентрация РНК измерялась с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen) и набора для измерения концентрации РНК (Invitrogen).

Электорофорез ДНК и РНК в агарозном геле

Необходимая навеска агарозы (НПФ «Литех») смешивалась с аликвотой TBE буфера (100 mM Tris, 100 mM борной кислоты, 100 mM EDTA, 50 или 100 мл) и нагревалась в микроволновой печи до растворения агарозы. К гелю добавлялся бромистый этидий из расчёта 5 мкл 1% бромистого этидия (НПФ «Литех») на 50 мл агарозного геля. Условия электрофореза подбирались следующим образом – для фрагментов ДНК < 1000 п.о. и препаратов тотальной РНК – 2% гель, 6 В/см, для библиотек кДНК – 2% гель, 4 В/см, для фрагментов ДНК > 1000 п.о. – 1% гель, 6 В/см. Для определения массы фрагментов ДНК использовались маркёры длин 100 bp ladder, 100 bp plus ladder (Thermo). Образцы наносились на гель в буфере, содержащем 10% глицерина, 1,6 mM Tris-HCl pH=7,6, 10 mM EDTA, 0,005% бромфенолового синего, 0,005% ксиленцианола.

Оценка качества выделенной РНК

Оценка качества выделенной РНК проводилась с помощью прибора для капиллярного электрофореза BioAnalyzer 2100 (Agilent) и набора RNA 6000 Pico Kit. Для этого на планшет для капиллярного электрофореза RNA 6000 Pico Chip наносилось 9 мкл смеси геля и маркёрного красителя с помощью системы для нанесения (Agilent). Затем на планшет наносилось 5 мкл маркёра длин и по 5 мкл

образцов РНК в диапазоне концентраций 50 пг – 5 нг. Перед нанесением образцы подвергались денатурации при 70С 2 мин. Для проведения электрофореза и последующего анализа данных использовалась программа 2100 Expert (Agilent). Показатель качества выделенной РНК – RIN составлял > 9. Профиль разделения тотальной РНК *M. gallisepticum* приведён на Рисунке 4.

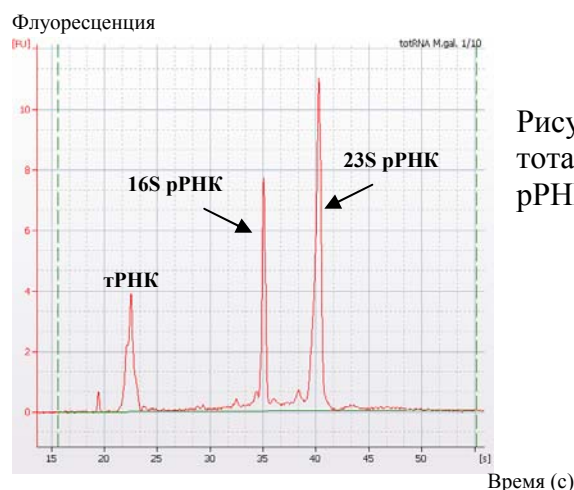


Рисунок 4. Электрофоретический профиль разделения тотальной РНК. Видны высокие пики тРНК, 16S рРНК, 23S рРНК (слева направо).

Выделение и солюбилизация белка для 2D-электрофореза

Клетки (1 мл) осаждались центрифугированием 10 мин. при 8000 g. Затем осадок ресуспендировался в 200 мкл промывочной среды (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, pH=7,4) с добавлением ингибитора протеаз (GE Healthcare) и осаждались центрифугированием 10 мин. при 8000 g. Процедура повторялась ещё один раз. Клеточный осадок лизировался в 3 мкл CHAPS с добавлением 0,5 мкл смеси нуклеаз (GE Healthcare). Смесь инкубировалась на льду 30 мин. Затем к лизату добавлялось 550 мкл воды, 60 мкл MeOH и 120 мкл CHCl₃. Смесь интенсивно перемешивалась и центрифугировалась 5 мин. при 16000 g для разделения фаз. Водная фаза отбиралась, а к органической фазе добавлялось 450 мкл MeOH. Содержимое пробирки перемешивалось. Затем проводилось центрифугирование 5 мин. при 16000 g. Супернатант отбирался, а осадок высушивался. Высушенный осадок белка растворялся в смеси 8М мочевины, 2М тиомочевины, 10М Tris, 4% CHAPS. Концентрация белка измерялась по Бредфорду.

Выделение белка и проведение одномерного электрофореза для последующего хромато-масс-спектрометрического анализа

Клетки (1 мл) осаждались центрифугированием 10 мин. при 8000 g. Затем осадок ресуспендировался в 200 мкл промывочной среды (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, pH=7,4) с добавлением ингибитора протеаз (GE Healthcare) и осаждались центрифугированием 10 мин. при 8000 g. Процедура повторялась ещё один раз. Клетки лизировались в 20 мкл раствора 1% SDS и 100 mM NH₄HCO₃. Затем проводилась инкубация в ультразвуковой бане 15 мин. с последующим центрифугированием при 10000 g и 4°C 5 мин. Супернатант отбирался, и концентрация белка определялась с помощью набора Bicinchoninic acid protein assay kit (Sigma). Затем к образцу добавлялось 20 мкл двукратного реактива Лэмли с последующей инкубацией 5 мин. при 95°C. Затем 50 мкг белка наносилось на полиакриламидный гель (10x0.1 см). Электрофорез проводился при 10 мА.

2.3. Секвенирование генома *Mycoplasma gallisepticum* S6

Подготовка библиотек для высокопроизводительного секвенирования геномной ДНК

Секвенирование генома *M. gallisepticum* S6 проводилось с помощью секвенатора GS FLX (Roche). Было отсеквенировано 12 независимых образцов ДНК, выделенных из 12 колоний *M. gallisepticum* S6, подрощенных 1 пассаж в жидкой среде. Фрагментация геномной ДНК осуществлялась с помощью небулайзера (Roche). Для этого 1 мкг ДНК в 100 мкл TE-буфера помещалось в небулайзер и смешивалось в 500 мкл буфера для фрагментации. Фрагментация проходила в потоке азота под давлением 1 бар 2 мин. После фрагментации к

образцу добавлялось 2,5 мл PBI-буфера. Для очистки фрагментированной ДНК использовался набор MinElute PCR Purification Kit (Qiagen). Для этого 750 мкл раствора фрагментированной ДНК наносилось на колонку. Колонка центрифугировалась при 10000g 1 мин. Элюат удалялся, затем на колонку наносилось 750 мкл PE-буфера. Колонка центрифугировалась 1 мин при 10000g. Элюат удалялся, образцы центрифугировались 2 мин при 16000g. ДНК элюировалась 16 мкл TE буфера в новую пробирку центрифугированием при 10000g 1 мин. Затем проводилась достройка концов фрагментов ДНК. Для этого приготавливалась смесь 2,5 мкл буфера для полинуклеотид-киназы T4, 2,5 мкл 10 mM АТФ, 1 мкл 10 mM дНТФ, 1 мкл полимеразы T4 (Roche), 1 мкл полинуклеотид-киназы T4 (Roche), 1 мкл Taq-полимеразы (Roche). Полученная смесь добавлялась к 16 мкл образца ДНК. Реакция проводилась в термоциклере по программе: 25°C – 20 мин, 72°C – 20 мин, 4°C – 5 мин. Затем к образцам добавлялось 1 мкл RL-адаптора и 1 мкл T4 ДНК-лигазы (Roche). Лигирование проводилось 10 мин при 25°C.

Очистка и селекция фрагментов ДНК по размеру проводилась с помощью магнитных шариков Agencourt AMPure Beads (Beckman Coulter). Для этого 125 мкл магнитных шариков осаждалось с помощью магнитного штатива. Супернатант удалялся. Затем к шарикам добавлялось 163 мкл TE-буфера, шарики ресуспендировались, и добавлялось 500 мкл буфера для связывания. Затем к шарикам добавлялся образец ДНК, и смесь инкубировалась 5 мин при комнатной температуре. Магнитные шарики осаждались с помощью магнитного штатива и супернатант удалялся. К шарикам добавлялось 190 мкл TE-буфера. Шарики ресуспендировались и к ним добавлялось 500 мкл буфера для связывания. Шарики осаждались и процедура повторялась один раз. Затем к осадку шариков добавлялся 1 мл 70% этанола. Шарики инкубировались 30 с и супернатант отбирался. Осадок шариков подсушивался в открытой пробирке 2 мин при комнатной температуре. К осадку шариков добавлялось 53 мкл TE-буфера. Шарики ресуспендировались и осаждались с помощью магнитного штатива, 50 мкл супернатанта отбиралось для дальнейшей работы. Количество образца

измерялось с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen). Диапазон длин библиотеки измерялся с помощью капиллярного электрофореза на приборе BioAnalyzer 2100 (Agilent).

Анализ данных геномного секвенирования, сборка контигов

Сборка контигов из прочтений, полученных с помощью секвенатора FLX осуществлялась с помощью программы MIRA 3 (<http://sourceforge.net/projects/mira-assembler/files/>).

Сборка скаффолдов

Контиги объединялись с помощью ПЦР с последующим секвенированием ампликонов по Сэнгеру. Для этого на концевые области контигов подбирались праймеры, при этом расстояние от праймера до конца контига составляло порядка 100-200 п.о. Затем проводилась амплификация с различными сочетаниями праймеров. Полученные ампликоны при необходимости разделялись в агарозном геле для очистки от неспецифических продуктов. Фрагменты геля, содержащие целевые ампликоны вырезались и ДНК выделялась с помощью набора GeneJet (Thermo). Для этого вырезанные фрагменты геля переносились в пробирку и взвешивались. После этого к ним добавлялся эквивалентный объём лизирующего буфера. Пробирки инкубировались при 65°C до полного растворения геля (не более 10 мин) с периодическим перемешиванием. Раствор переносился на колонки GeneJet (Thermo) с последующим центрифугированием 1 мин. при 16000g. Элюат отбирался, и на колонку наносилось 700 мкл промывочного буфера с последующим центрифугированием 1 мин. при 16000g. Процедура повторялась ещё один раз. Элюат отбирался и колонка центрифугировалась 2 мин. при 16000g для полного удаления промывочного буфера. ДНК элюировалась в новую пробирку 20 мкл буфера для элюции. Концентрация ДНК измерялась с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen) и набора для измерения концентрации ДНК (Invitrogen).

Секвенирование по Сэнгеру проводилось с помощью набора BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit (Invitrogen) и секвенатора ABI 3730XL (Applied Biosystems). Полученные данные анализировались с помощью программы BioEdit.

Аннотация генома

Геном *M. gallisepticum* S6 депонирован в базе данных геномов NCBI, идентификатор в геномной базе данных NCBI ASM21154v4. Аннотация генома проводилась с помощью сервисов NCBI после депонирования последовательности в базу данных геномов NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>.

2.4. Измерение транскрипционной активности *M. gallisepticum* (транскриптомика)

Синтез кДНК для проведения ПЦР

Препарат РНК обрабатывался ДНКазой I (Thermo). Для этого к 10 мкл раствора РНК (порядка 1 мкг РНК) добавлялось 1 мкл буфера для ДНКазы I (Thermo), 2 ед. ДНКазы I (Thermo), 8 ед. ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo). Смесь инкубировалась 45 мин при 37°C. Затем к образцу добавлялось 0,5 мкл случайного гексамерного праймера. Образец инкубировался 5 мин при 75°C и затем переносился в лёд. К аликвоте в 9 мкл образца РНК добавлялось 4 мкл буфера для обратной транскриптазы (Thermo), 4 мкл смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, 100 ед. обратной транскриптазы H-minus Reverse Transcriptase (Thermo), 8 ед. ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo), финальный объём – 9 мкл. Смесь инкубировалась 45 мин при 42°C.

Количественная ПЦР в реальном времени

Для проведения количественной ПЦР в реальном времени использовался следующий состав реакционной смеси: 1х ПЦР буфер (НПФ «Литех»), 0,2 мМ каждого дНТФ, 5 пмоль каждого из праймеров, 0,75 ед. Taq-полимеразы (НПФ «Литех»), 0,5х SYBR Green (Promega), 2% формамида. Финальный объём реакции составлял 21 мкл. ПЦР проводилась на приборе C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad) по следующей программе:

Шаг 1 – икубация 96°C 1 мин

Шаг 2 – инкубация 96°C 15 с

Шаг 3 – инкубация 58°C 20 с

Шаг 4 – инкубация 65°C 60 с, снятие спектра флуоресценции

Шаг 5 – возврат к шагу 2, 40 циклов

Для определения специфичности реакции после проведения ПЦР определялась кинетика плавления ПЦР-продукта. Первичный анализ результатов проводился с помощью программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad).

Подбор праймеров осуществлялся с помощью авторского программного обеспечения. Алгоритм принципиально основан на данных из публикаций SantaLuchia и др. [79]. Праймеры подбирались со следующими параметрами: температура плавления от 58°C до 62°C с разбросом для пары праймеров не более 2°C, длина праймеров от 22 до 26 нуклеотидов, длина ампликона 300-310 п.о., ГЦ-контент ампликона 40-60%. При подборе праймеров на кодирующие участки генома, пара праймеров должна была отжигаться на середину открытой рамки считывания. Праймеры проверялись на предмет образования стабильных вторичных структур, а также их способность к образованию побочных ПЦР-продуктов при помощи авторского программного обеспечения. Для проведения ПЦР отбирались праймеры не образующие стабильных вторичных структур при температуре отжига. Список праймеров приведён в таблице 1 дополнительных материалов.

Удаление рибосомальной РНК из образца тотальной РНК с помощью гибридизации

Для удаления рРНК были синтезированы зонды, несущие биотин на 5'-конце (коммерческие наборы для удаления рРНК с помощью гибридизации не работают на микоплазмах). Для этого были амплифицированы фрагменты 16S и 23S рРНК из геномной ДНК длиной порядка 300 п.о. Полученные фрагменты использовались в качестве матрицы для синтеза одноцепочечных зондов с помощью достройки биотинилированных олигонуклеотидов Taq-полимеразой. Полученные зонды перекрывали последовательность каждой из рРНК на 80%.

Гибридизация проводилась в растворе, содержащем 50% формамида, 10 mM Tris, 2,5 mM $MgCl_2$, 3 мкл смеси зондов против рРНК, 2 мкг тотальной РНК. Смесь инкубировали при 60°C 5 мин. Затем образцы инкубировались при комнатной температуре до остывания. Образцы смешивались с 200 мкл магнитных шариков со стрептавидином Streptavidin MagneSphere (Promega) и инкубировались на столе 5 мин с периодическим перемешиванием. Магнитные шарики осаждались с помощью магнитного штатива и супернатант отбирался. К нему добавлялось 200 мкл изопропанола и 5 мкл 3 M ацетата натрия (pH=5,2). Образцы инкубировались 15 мин при -70°C или ночь при -20°C. РНК осаждалась центрифугированием 30 мин при 16000g. Изопропанол отбирался и осадок промывался 100 мкл 80% этанола. Образцы центрифугировались 5 мин при 16000g. Осадок растворялся в 10 мкл воды (Panreac).

Приготовление библиотек для высокопроизводительного направленного секвенирования РНК

Для приготовления библиотек для высокопроизводительного секвенирования использовались препараты тотальной РНК или РНК, обеднённой рРНК. Препарат РНК подвергался фрагментации с использованием сульфата цинка или РНКазы III. Затем происходило лигирование адаптеров и синтез кДНК. Для приготовления библиотек использовались наборы Total RNA-Seq Kit и SOLiD RNA Barcoding Kit (Life Technologies).

Для фрагментации сульфатом цинка аликвота РНК (1-20 мкг) смешивался с 2 мкл буфера для фрагментации (100 mM Tris, 100 mM ZnSO₄, pH=7,0). Суммарный объём реакции составлял 20 мкл. Образец инкубировался при 70°C 10 мин. Затем реакция останавливалась добавлением 2 мкл 200 mM EDTA (pH=8,0). К образцам добавлялось 80 мкл воды, 100 мкл изопропанола и 5 мкл 3 M ацетата натрия (pH=5,2). Образцы инкубировались 15 мин при -70°C или ночь при -20°C. РНК осаждалась центрифугированием 30 мин при 16000g. Изопропанол отбирался и осадок промывался 100 мкл 80% этанола. Образцы центрифугировались 5 мин при 16000g. Осадок растворялся в 10 мкл воды (Panreac). Затем проводилась обработка концов фрагментов РНК для последующего лигирования адаптеров. К 15 мкл РНК добавлялось 2 мкл 10x буфера для T4 полинуклеотидкиназы (Thermo), 1 мкл T4 полинуклеотидкиназы (Thermo) и 2 мкл 10 mM раствора АТФ. Смесь инкубировалась при 37°C 20 мин. Реакция останавливалась инкубированием 5 мин при 70°C. К образцам добавлялось 80 мкл воды, 100 мкл изопропанола и 5 мкл 3 M ацетата натрия (pH=5,2). Образцы инкубировались 15 мин при -70°C или ночь при -20°C. РНК осаждалась центрифугированием 30 мин при 16000g. Изопропанол отбирался и осадок промывался 100 мкл 80% этанола. Образцы центрифугировались 5 мин при 16000g. Осадок растворялся в 10 мкл воды (Panreac). Распределение длин фрагментов РНК измерялось с помощью капиллярного электрофореза на приборе BioAnalyzer 2100 (Agilent). Диапазон длин фрагментов РНК составлял 150-200 нт. Концентрация РНК измерялась с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen) и набора для измерения концентрации РНК (Invitrogen). Полученная РНК использовалась для лигирования адаптеров.

Для фрагментации РНКазой III аликвота РНК (0,5-1 мкг в 8 мкл) смешивалась с 1 мкл буфера для РНКазы III (Ambion) и 1 мкл РНКазы III (Ambion). Смесь инкубировалась 10 мин. при 37°C. Затем к образцам добавлялось 90 мкл воды, и образцы переносились в лёд. Очистка фрагментированной РНК проводилась с помощью концентрирующего модуля для набора RiboMinus (Invitrogen). Для этого к образцам добавлялось 100 мкл буфера для связывания L3

и 250 мкл этанола. Образцы тщательно перемешивались и наносились на колонку. Образцы центрифугировались 1 мин при 16000g. Элюат отбирался, колонка промывалась 500 мкл промывочного буфера центрифугированием 1 мин при 16000g. Затем образцы центрифугировались 2 мин при 16000g для удаления остатков промывочного буфера. РНК элюировалась с колонки 12 мкл воды центрифугированием 1 мин при 16000g. Распределение длин фрагментов РНК измерялось с помощью капиллярного электрофореза на приборе BioAnalyzer 2100 (Agilent). Диапазон длин фрагментов РНК составлял 150-200 нт. Концентрация РНК измерялась с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen) и набора для измерения концентрации РНК (Invitrogen). Полученная РНК использовалась для лигирования адаптеров.

Для гибридизации адаптеров 3 мкл гибридизационного буфера (Ambion) смешивалось на льду с 2 мкл смеси адаптеров (Ambion) для секвенирования на платформе SOLiD. Затем добавлялось 3 мкл фрагментированной РНК. Образцы перемешивались и помещались в амплификатор, где они инкубировались по следующей схеме – 65°C 10 мин., затем 16°C 5 мин. Затем к образцам добавлялось 10 мкл 2хбуфера для лигирования (Ambion) и 2 мкл лигазной смеси (Ambion). Образцы инкубировались в амплификаторе 16 часов при 16°C.

Для проведения реакции обратной транскрипции приготавливалась реакционная смесь: 11 мкл воды, 4 мкл 10х буфера для обратной транскрипции, 2 мкл раствора дНТФ, 2 мкл праймера, 20 мкл лигазной реакции. Смесь инкубировалась при 70°C 5 мин., затем помещалась на лёд. К образцам добавлялось 1 мкл обратной транскриптазы ArrayScript (Ambion). Образцы инкубировались 30 мин при 42°C.

Образцы кДНК подвергались дальнейшей очистке с помощью магнитных шариков Agencourt AMPure XP Reagent (Beckman Coulter). 72 мкл суспензии магнитных шариков добавлялись к 40 мкл образца кДНК. Образцы перемешивались и инкубировались 5 мин при комнатной температуре. Затем магнитные шарики отделялись с помощью магнитного штатива, и супернатант отбирался. К магнитным шарикам добавлялось 200 мкл 70% этанола и образцы

инкубировались 30 с при комнатной температуре. Затем этанол отбирался. Для элюции кДНК к образцам добавлялось 40 мкл воды. Шарики отделялись с помощью магнитного штатива, и супернатант отбирался и переносился в новую пробирку. К 40 мкл кДНК добавлялось 64 мкл магнитных шариков, и процедура повторялась. Затем происходила амплификация кДНК.

Для амплификации кДНК приготавливалась реакционная смесь: 33,4 мкл воды, 5 мкл 10x буфера для ПЦР, 5 мкл раствора дНТФ, 1 мкл 5'-праймера, 1 мкл 3'-праймера с баркодом, 0,6 мкл ДНК-полимеразы AmpliTaq (Ambion), 5 мкл кДНК. ПЦР проводилась по следующей программе:

Шаг 1 – икубация 95°C 5 мин

Шаг 2 – инкубация 95°C 30 с

Шаг 3 – инкубация 62°C 30 с

Шаг 4 – инкубация 72°C 30 с

Шаг 5 – возврат к шагу 2, 12 циклов

Шаг 6 – инкубация 72°C 7 мин

Амплифицированная кДНК подвергалась очистке с помощью набора PureLink PCR Micro Kit (Invitrogen). Для этого к 50 мкл амплифицированной кДНК доавлялось 200 мкл буфера для связывания (B2) и образцы наносились на колонку. Проводилось центрифугирование 1 мин при 10000g. Элюат отбирался. На колонку наносилось 600 мкл промывочного буфера (W1) и проводилось центрифугирование 1 мин при 10000g. Элюат отбирался и процедура промывки повторялась. Затем образцы центрифугировались 2 мин при 16000 для удаления промывочного буфера. Очищенная кДНК смывалась 10 мкл буфера для элюции центрифугированием 1 мин при 16000g. Процедура элюции повторялась ещё раз и элюаты объединялись. Качество приготовления библиотек оценивалось с помощью капиллярного электрофореза на приборе BioAnalyzer 2100 (Agilent). Концентрация кДНК измерялась с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen) и набора для измерения концентрации кДНК (Invitrogen).

Далее проводилась нормализация библиотек кДНК, полученных из образцов тотальной РНК. Для этого аликвоты кДНК (400-1000 нг в 12 мкл) смешивались с 4 мкл гибридизационного буфера (200 мМ HEPES, 2М NaCl, pH=7,5). Далее образцы помещались в термоциклер и инкубировались по следующей схеме: икубация 98°C 2 мин, затем инкубация 68°C 5 часов. Затем добавлялось 32 мкл буфер для нуклеазы DSN. Смесь инкубировалась при 68°C 10 мин. Затем добавлялось 0,5 мкл нуклеазы DSN (Евроген) и образцы инкубировались 15 мин при 68°C. Реакция останавливалась добавлением 64 мкл 200 мМ EDTA (pH=8,0). Затем добавлялся равный объём изопропанола и образцы инкубировались ночь при -20°C. Затем проводилось центрифугирование 20 мин при 16000g. Супернатант отбирался, и добавлялось 100 мкл 80% этанола. Проводилось центрифугирование 4 мин при 16000g. Затем нормализованная кДНК амплифицировалась и очищалась как описано выше. Для ряда образцов процедура нормализации повторялась двукратно. Затем образцы нормализованной кДНК подвергались очистке с помощью агарозного электрофореза (см. *Электорофорез ДНК и РНК в агарозном геле*). Фрагменты агарозного геля с кДНК в диапазоне 200-300 п.о. вырезались, и кДНК выделялась с помощью набора SOLiD Library Quick Gel Extraction kit (Life Technologies). Для этого фрагмент геля переносился в пробирку и взвешивался. К образцам добавлялось 30 мкл буфера для солиubilизации (L3) на 10 мг геля. Образцы интенсивно перемешивались до растворения геля. К раствору добавлялся равный объём изопропанола. Смесь наносилась на колонку. Образцы центрифугировались 1 мин при 10000g. Элюат отбирался и на колонки наносилось 500 мкл промывочного буфера, и проводилось центрифугирование 1 мин при 10000g. Затем элюат отбирался и образцы центрифугировались 2 мин при 16000g. Очищенная кДНК смывалась 10 мкл буфера для элюции E1 из набора SOLiD Library Column Purification Kit (Life Technologies) центрифугированием 1 мин при 16000g. Полученные библиотеки использовались для секвенирования с помощью высокопроизводительного секвенатора SOLiD 4 (Life Technologies).

Приготовление библиотек для высокопроизводительного направленного секвенирования РНК, обогащённых 5'-концевыми последовательностями

РНК подвергалась фрагментации с помощью $ZnSO_4$ как описано выше. Затем РНК подвергалась обработке полинуклеотидкиназой Т4, как описано выше. Далее РНК обрабатывалась нуклеазой Terminator (Epicentre). Для этого приготавливалась реакционная смесь: 2 мкл буфера А (Epicentre), 0,5 мкл ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo), 1 мкл нуклеазы Terminator (Epicentre), 16,5 мкл водного раствора РНК. Образцы инкубировали при 30°C 1 час. К образцам добавляли 80 мкл воды и 100 мкл изопропанола и проводили переосаждение РНК, как описано выше. Осадок РНК растворялся в 10 мкл воды и подвергался обработке кислой фосфатазой табака. Для этого к 10 мкл РНК добавлялось 2 мкл буфера для кислой фосфатазы (Epicentre), 1 мкл кислой фосфатазы (Epicentre), 0,5 мкл ингибитора РНКаз, 6,5 мкл воды. Образцы инкубировались 30 мин при 37°C. К образцам добавляли 80 мкл воды и 100 мкл изопропанола и проводили переосаждение РНК, как описано выше. Осадок РНК растворялся в 12 мкл воды. Распределение длин фрагментов РНК измерялось с помощью капиллярного электрофореза на приборе BioAnalyzer 2100 (Agilent). Диапазон длин фрагментов РНК составлял 150-200 нт. Концентрация РНК измерялась с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen) и набора для измерения концентрации РНК (Invitrogen). Полученная РНК использовалась для лигирования адаптеров и приготовления библиотек для секвенирования как описано выше. Общая схема метода представлена на Рисунке 5.

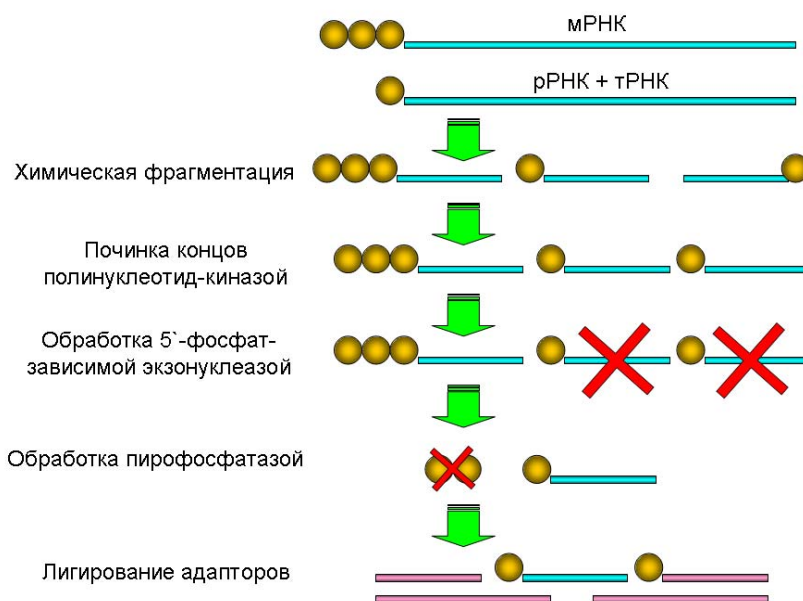


Рисунок 5. Схема получения библиотеки, обогащённой 5'-концевыми последовательностями.

Статистический анализ данных ПЦР

Для нормализации данных по уровням мРНК использовалась 23S рРНК. Логарифм уровня мРНК ($\log_2$) сравнивался с контролем, в качестве которого использовалась культура в логарифмической фазе роста. Для определения уровня статистической значимости изменения мРНК использовался t-критерий с коррекцией на множественное тестирование по Бенджамини-Хохбергу. Изменения мРНК считались статистически значимыми при q-value менее 0,05.

Определение паттернов изменения транскрипции генов в процессе теплового стресса

Данные по уровням мРНК ($\log_2$) в 15 и 30 мин. были усреднены. Затем вычислялся порядок каждой мРНК в точках контроль, 5 мин и 15-30 мин. Точка с максимальным уровнем экспрессии получала порядок равный 1, с минимальным – равный 3. Гены с одинаковым порядком объединялись в паттерны.

Обработка данных по транскриптомике

Обработка данных по транскрипционному профилированию проводилась с использованием программного обеспечения R и пакетов edgeR и SAJR.

Нормализация транскрипционных данных проводилась на суммарный сигнал всех кодирующих последовательностей. Диапазон вариации нормализационных факторов составил 1.9 - 2.7 для всех библиотек кроме стационарной фазы. Для стационарной фазы и теплового стресса в стационарной фазе нормализационный фактор составлял 0.13 - 0.32. Оценка вариабельности покрытия проводилась с помощью генерализованных линейных моделей, с квазипуассоновским распределением. В процедуре разметки интервалов остоверность отличия покрытий между интервалами оценивалась с помощью теста на квази-логправдоподобие.

Поиск мотивов

Поиск мотивов в нуклеотидных последовательностях осуществлялся с помощью сервиса MEME <http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>. Поиск мотивов в геноме проводился с помощью весовых матриц.

2.5. Протеомный анализ *M. gallisepticum* (протеомика)

Двумерный электрофорез

Препарат тотального белка *M. gallisepticum* подвергался окраске цианинами Cy3 или Cy5 (GE Healthcare) в соотношении 1 мкл цианина на 50 мкг белка. Смесь инкубировалась на льду в течение 45 мин. в темноте. Реакция мечения останавливалась добавлением 1 мкл 10мМ лизина. Выравнивание по суммарной интенсивности флуоресценции каждого из цианинов в паре проводилось с помощью одномерного электрофореза по Лэмли. Для этого к 1 мкл меченного препарата белка добавлялось 10 мкл реактива Лэмли (1M Tris, 10% SDS, глицерина, бромфенола, 5% DTT) и проводилась инкубация при 95°C 5 мин. Затем образец наносился на полиакриламидный гель (4% концентрирующий гель,

7% разделяющий гель). Электрофорез проводился в следующих условиях: 10 мА до входа в разделяющий гель, 20 мА после входа в разделяющий гель. Гель сканировался с помощью инструмента Typhoon. Затем измерялась суммарная флуоресценция для каждого образца с помощью программы ImageQuant. В результате вычислялся поправочный коэффициент для смешивания образцов перед нанесением образца на первое направление (изоэлектрическое фокусирование).

Изоэлектрическое фокусирование проводили в трубочках (20 см x 1.5 мм). Для этого в трубочки заливался гель (на 6 образцов 680 мкл воды, 1 г мочевины, 292 г/л акриламида, 9 г/л бис-акриламида, 35 мкл раствора амфолинов 3-10, 70 мкл раствора амфолинов 5-8, 2 мкл TEMED, 4 мкл 10% ПСА). На гель наносилось 50 мкг белка. Для изоэлектрической фокусировки использовались следующие буферы: щелочной 50 мМ NaOH, кислый 20 мМ H_3PO_4 . Изоэлектрическая фокусировка проводилась при следующих параметрах тока: первые 60 мин – градиент от 100 до 600 В, 10 часов при 700 В, 1-1,5 часа при 900 В. После окончания фокусировки гель извлекался из трубочек и помещался в уравнивающий буфер (6 М мочевины, 40% глицерина, 3% SDS, 65 мМ ДТТ, 250 мл 0,5 М Tris-HCl pH=6,8) на 30 мин. После уравнивания гель из трубочки наносился на гель второго направления (градиентный гель 9-16% акриламида, 20 x 18 см x 1,5 мм) и фиксировался 0,9% агарозным гелем с 0,01% бромфенолового синего. Второе направление электрофореза проводилось по следующей схеме: 20 мин 20 мА, 2 часа 40 мА, 3 часа 35 мА в Tris-глициновом буфере (14,4 г/л глицина, 3 г/л Tris, 1 г/л SDS).

Трипсинолиз и идентификация белков с помощью MALDI-масс-спектрометрии

Двумерный гель фиксировался раствором, содержащим 20% CH_3OH и 10% CH_3COOH в течение 30 мин. Затем гель дважды промывался в воде и окрашивался нитратом серебра. Для этого гель обрабатывался тиосульфатом натрия (3 г/л) в течение 2 мин. Гель трижды промывался водой. Затем к гелю добавлялся раствор нитрата серебра (1 г/л нитрата серебра, 1 мл/л 37% раствора

формалина) и инкубировался 10 мин. Гель трижды промывался водой. Затем к нему добавлялся проявитель (40 г/л Na_2CO_3 , 0,6 г/л тиосульфата натрия, 10 мл/л 37% раствора формалина). Проявка контролировалась визуально и останавливалась 10% раствором уксусной кислоты.

Пятно, соответствующее определённому белку вырезалось из геля с помощью обрезанного наконечника на 200 мкл. Фрагмент геля переносился в пробирку и инкубировался в воде 15 мин. Затем вода отбиралась и к геля добавлялось 100 мкл ацетонитрила. Образцы инкубировались на столе 20 мин. Ацетонитрил отбирался и образцы подсушивались при комнатной температуре 20 мин. Рабочий раствор трипсина приготавливался добавлением 68 мкл воды и 27 мкл 200 мМ раствора гидрокарбоната аммония к 5 мкл стокового раствора трипсина (20 мкг лиофилизированного трипсина Trypsin Gold (Promega) в 100 мкл 50 мМ уксусной кислоты, аликвоты хранились при -20°C). К образцу геля добавлялось 10 мкл рабочего раствора трипсина, и образцы инкубировались на льду 30 мин. Затем для проведения трипсинолиза образцы инкубировали 30 мин при 50°C или ночь при 37°C . Для экстракции пептидов к образцам добавлялось 10 мкл 0,5% водного раствора трифторуксусной кислоты. Образцы инкубировались 30 мин на столе.

Аликвота (1 мкл) образца смешивалась с 0,3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мг/мл) в 30% ацетонитриле и 0,5% трифторуксусной кислоты и наносилась на стальную мишень. Образец инкубировался при комнатной температуре до полного высыхания. Масс-спектр снимался на приборе Ultraflex II MALDI-ToF-ToF mass spectrometer (Bruker Daltonik, Germany) с неодимовым лазером. Молекулярные ионы $[\text{MH}]^+$ измерялись в режиме рефлектора с точностью измерения массы 0,007%. Спектр фрагментных ионов получался с помощью лазер-индуцированной диссоциации, ускоренной диссоциацией с помощью столкновения родительских ионов с молекулами инертного газа на низких энергиях. В качестве инертного газа использовался гелий. Точность измерения массы фрагментных ионов составляла 1 Да. Идентификация пар родительских и фрагментных ионов проводилась с

помощью программного обеспечения Biotoools software (Bruker Daltonik, Germany) и Mascot.

Трипсинолиз для проведения хромато-масс-спектрометрического анализа

Полиакриламидный гель фиксировался раствором, содержащим 20% CH_3OH и 10% CH_3COOH в течение 30 мин. Затем гель дважды промывался в воде. Гель нарезался на фрагменты 1x1 мм. Каждый фрагмент переносился в пробирку с 10 мМ ДТТ и 100 мМ гидрокарбоната аммония и инкубировался 30 мин. при 56°C. Затем белки подвергались алкилированию с помощью 55 мМ йодоацетамида в 100 мМ NH_4HCO_3 в течение 20 мин. в темноте. Затем раствор отбирался, и добавлялось 100 мкл ацетонитрила. Затем проводилась процедура трипсинолиза как описано выше. Пептиды экстрагировались 5% муравьиной кислотой и затем дважды 50% ацетонитрилом с 5% муравьиной кислоты. Экстракты объединялись и высушивались при 45°C на вакуумной центрифуге. Осадки растворялись в 50 мкл 5% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислоты.

Хромато-масс-спектрометрическая идентификация пептидов

Идентификация пептидов проводилась с помощью масс-спектрометра TripleTOF 5600+ (ABSciex) с ионным источником NanoSpray III и хроматографической системой NanoLC Ultra 2D+ (Eksigent). Хроматографическое разделение проводилось в градиенте ацетонитрила в водном растворе (от 5 до 40% ацетонитрила за 120 мин.) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты. Для хроматографического разделения использовались 75x150 мкм колонки с 3 мкм сорбентом Phenomenex Luna C18 и потоком 300 nL/min. Для анализа пептидов использовался режим IDA, диапазон масс для анализа и последующего отбора родительских ионов составлял 300-1250 m/z, время аккумуляции сигнала составляло 250 мс. На основании MS1 спектра производился отбор 50 родительских ионов с максимальной интенсивностью в данном спектре для последующего MS/MS анализа. Разрешение квадрупольно-ионного пучка составляло 0,7 Да, диапазон измерения масс составлял 200-1800 m/z, ионный пучок был

оптимизирован для получения сигнала максимальной интенсивности. Время аккумуляции сигнала для каждого родительского иона составляло 50 мс. Для получения фрагментных ионов использовался механизм диссоциации с помощью соударения с молекулами азота. В процессе накопления сигнала энергия соударения линейно увеличивалась от 25 до 55 В. Уже проанализированные родительские ионы исключались из анализа на 15 с.

Анализ хромато-масс-спектрометрических данных

Сырые данные анализировались с помощью программы ProteinPilot 4.5 revision 1656 (ABSciex). Для поиска пептидов использовалась база данных по всем белкам *M. gallisepticum* S6. Поиск проводился с учётом триптического гидролиза и алкилирования остатков цистеина йодоацетамидом. Спектры группировались с помощью встроенного в ProteinPilot алгоритма ProGroup. Статистический анализ результатов проводился с помощью алгоритма ProteomicS Performance Evaluation Pipeline Software (PSPEP), встроенного в ProteinPilot. Идентификация считалась достоверной при скоринге выше 31.

Измерение представленности белков с помощью MRM

Список родительских и фрагментных ионов был подобран на основе данных IDA. Для MRM использовались ионы, представленные во всех анализируемых состояниях. Для каждого белка было выбрано не менее трёх переходов. Результаты MRM анализировались с помощью программного пакета R. Для каждого состояния использовалось три биологических и три технических повтора.

Предсказание мембранной топологии белков

Поиск трансмембранных доменов осуществлялся с помощью сервера TMHMM <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.

2.6. Биохимические исследования

Измерение внутриклеточного содержания АТФ

Аликвота клеточной культуры (50 мкл) растворялась в ДМСО. Измерения проводились с помощью наборов реагентов и оборудования компании Люмтек.

Гемагглютинация

Куриная кровь отбиралась в цитратный буфер (3 мМ лимонной кислоты, 30 мМ цитрата натрия, 100 мМ глюкозы, 70 мМ NaCl) в соотношении 1:3 цитратный буфер:кровь. Аликвота куриной крови (4 мл) доводилась до 10 мл с помощью фосфатно-солевого буфера и центрифугировалась при 500g 10 мин. Супернатант отбирался и осадок эритроцитов промывался 10 мл фосфатно-солевого буфера. Процедура повторялась дважды. В результате осадок эритроцитов растворялся в 10 мл фосфатно-солевого буфера с добавлением 1% азида натрия. Рабочий раствор куриных эритроцитов приготавливался путём десятикратного разведение стокового раствора куриных эритроцитов. Для анализа гемагглютинации приготавливалась серия двукратных разведений культуры *M. gallisepticum* в разных состояниях в 96-луночном планшете. Затем к образцам культуры добавлялось равное количество рабочего раствора куриных эритроцитов. Смесь инкубировалась на столе до окончания реакции. Протекание реакции фиксировалось визуально.

3. Результаты

3.1. Определение полной нуклеотидной последовательности генома *M. gallisepticum* S6

В процессе выполнения настоящей работы нами была установлена полная нуклеотидная последовательность генома *M. gallisepticum* S6 (идентификатор в геномной базе данных NCBI ASM21154v4). Трудность определения полной нуклеотидной последовательности *M. gallisepticum* состоит в том, что у данного (и некоторых родственных) вида микоплазм в геноме присутствуют протяжённые кассеты генов гемагглютининов *vlhA*. Гены гемагглютининов вместе с промоторами составляют более 2000 п.о. при длине кассет порядка 20000 п.о. Более того, гены *vlhA* являются высоко гомологичными с одной стороны и «мозаичными» с другой, т.е. ген разные участки некоторого гена *vlhA* гомологичны соответствующим участкам нескольких других генов *vlhA*. В геноме *M. gallisepticum* S6 насчитывается четыре кассеты *vlhA* длиной 19440, 17216, 28389 и 19765 п.о. в которых содержится в общей сложности 44 гена семейства *vlhA*.

3.2. Транскрипционный анализ *M. gallisepticum*

Отработка биологических моделей стрессовых воздействий

Для исследования адаптации *M. gallisepticum* к стрессу нами были созданы соответствующие биологические модели. При их создании были поставлены две

цели – максимизация силы воздействия при сохранении жизнеспособности большинства клеток. Первое условие было необходимо для обеспечения высокой амплитуды ответа, регистрируемого в виде изменения уровней экспрессии генов. Соответствующие дозы далее называются «сублетальными дозами». Результаты суммированы в таблице 1. В опытах время воздействия составляло 30 мин, за исключением теплового стресса, для которого была получена кинетика ответа, включавшая точки 5, 15 и 30 минут.

Воздействие	Доза
Тепловой стресс	46°C
Окислительный стресс H ₂ O ₂	0,02%
Осмотический стресс NaCl	1,2M
Карбонил-цианид 3-хлорфенилгидразон	50 мкг/мл
Новобиоцин	50 мкг/мл
Резерпин	8 пмоль/мл

Таблица 1. Сублетальные дозы воздействий на *M. gallisepticum*, определённые в данной работе.

Отработка технологии фрагментации РНК

В настоящее время благодаря развитию технологий высокопроизводительного секвенирования стало возможным применять их для идентификации и количественного измерения транскриптов. Далее такая процедура будет называться, для краткости, секвенированием РНК, хотя непосредственно процедуре секвенирования подвергается, конечно, кДНК. Подготовка библиотек кДНК для высокопроизводительного секвенирования обязательно включает стадию фрагментации исследуемой РНК или её полноразмерной кДНК в зависимости от стратегии секвенирования. Существуют две принципиально различающиеся стратегии секвенирования, которые в англоязычной литературе носят названия *directional (strand-specific)* и *non-directional (non-strand-specific)*. В первом случае в результате секвенирования, помимо локализации, можно также получить информацию о цепи геномной ДНК, с которой считался соответствующий транскрипт. Во втором – эта информация теряется и можно только идентифицировать место в геноме, откуда считался данный транскрипт, но не его направление. В настоящей работе мы выбрали стратегию секвенирования *directional*, которая далее будет называться

направленным секвенированием. Другая стратегия будет называться, соответственно, *ненаправленным* секвенированием. Для направленного секвенирования фрагментацию нужно обязательно проводить на стадии РНК, а для ненаправленного это не принципиально. При этом провести направленное секвенирование полноразмерной кДНК с помощью секвенаторов второго поколения принципиально невозможно без специального включения меток в одну из цепей.

Процедуры фрагментации, нормализации (см. подраздел *Отработка технологии нормализации транскриптомных библиотек*) и эффект переамплификации, могут вносить ошибки в получаемые результаты вследствие искажения представленности фрагментов в секвенируемых библиотеках в большую или меньшую сторону. Существуют следующие причины искажения представленности фрагментов. При энзиматической фрагментации точки расщепления РНК привязаны к вторичным структурам, что делает распределение фрагментов неслучайным. Фрагменты с разными физико-химическими свойствами могут амплифицироваться и секвенироваться с разной эффективностью. При нормализации удаление фрагментов с разными физико-химическими свойствами также может происходить не равномерно. Вследствие этого, изначально неслучайное распределение фрагментов больше подвержено влиянию факторов, искажающих представленность этих фрагментов.

Искажение количественной представленности фрагментов может привести к следующим проблемам: искажению количественных данных по представленности транскриптов (и дифференциальной экспрессии в разных условиях), невозможности сборки полноразмерных транскриптов, невозможности картирования сайтов инициации и терминации транскрипции. Сборка транскриптов имеет значение как в плане идентификации непрерывно транскрибирующихся участков – бактериальных оперонов, так и в плане поиска некодирующих РНК в цис и транс положении. Неравномерность покрытия существенно снижает точность определения точек инициации и терминации транскрипции методом скользящего окна и может привести к большому

количеству ложноположительных результатов. В данной работе мы (совместно с А. Ю. Горбачёвым и П. В. Мазиным) провели исследование влияния двух типов фрагментации РНК – химической (с помощью ZnSO_4) и энзиматической (с помощью РНКазы III) – на равномерность покрытия. Энзиматическая фрагментация является стандартным методом фрагментации РНК согласно протоколу компании-производителя серии секвенаторов SOLiD (LifeTechnologies). В результате было выяснено, что химическая фрагментация даёт существенно более равномерное покрытие, чем энзиматическая (Рисунок 6).

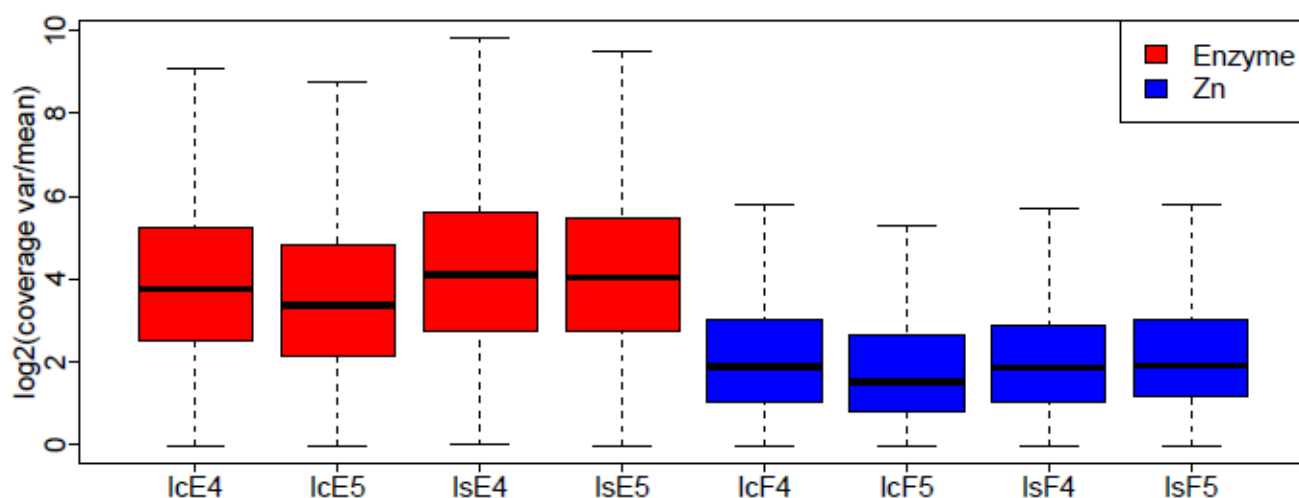


Рисунок 6. Характеристика равномерности покрытия при использовании разных типов фрагментации РНК. По вертикальной оси отношение разброса в покрытии к среднему покрытию. Клетки в логарифмической фазе, образцы: IcE4 – контроль биореплики 1, IcE5 – контроль биореплики 2, IsE4 – тепловой стресс биореплики 1, IsE5 – тепловой стресс биореплики 2, IcF4 – контроль биореплики 1, IcF5 – контроль биореплики 2, IsF4 – тепловой стресс биореплики 1, IsF5 – тепловой стресс биореплики 2. Красным отмечены образцы с энзиматической фрагментацией (РНКазы III), синим – с химической фрагментацией (ZnSO_4). Видно, что равномерность покрытия при использовании химической фрагментации в среднем в 4 раза выше.

Отработка технологии нормализации транскриптомных библиотек

Одной из главных проблем при транскрипционном профилировании методом высокопроизводительного секвенирования является чрезвычайно низкая представленность мРНК (1 %) в пуле тотальной РНК. Вследствие этого, при секвенировании тотальной РНК большая часть (99% соответственно) прочтений приходится на рРНК и тРНК, т.е. фактически глубина прочтения уменьшается на два порядка относительно номинальной. Для снижения относительной представленности рРНК и тРНК и увеличения представленности других типов

РНК (мРНК, малых некодирующих РНК) используются специальные процедуры, объединяемые общим термином «нормализация» (РНК или кДНК). Существует несколько стратегий нормализации. Наиболее проста и распространена технология выделения фракции мРНК за поли-А последовательности. Однако, эта технология принципиально не применима для бактерий ввиду того, что полиаденилирование у бактерий отсутствует или является сигналом деградации РНК (и кроме того позволяет идентифицировать только фракцию поли-А РНК). Помимо этого существуют ещё три основные стратегии нормализации: гибридизация с зондами против рРНК, удаление рРНК с помощью 5'-фосфат-зависимой экзонуклеазы, нормализация библиотек кДНК с помощью гибридизации и расщепления дуплекс-специфической нуклеазой. Последний метод принципиально отличается от первых тем, что нормализация происходит на уровне кДНК, а не РНК. Эти три метода позволяют снижать представленность только рРНК, но не тРНК. Это происходит вследствие физико-химических особенностей тРНК – высокой доли стабильных вторичных и третичных структур на единицу длины. Удаление тРНК с помощью гибридизации требует большого набора зондов. Также тРНК не гидролизуются 5'-фосфат-зависимой экзонуклеазой вследствие недоступности 5'-конца, который скрыт внутри трёхмерной структуры. Нормализация кДНК с помощью гибридизации и расщепления дуплекс-специфической нуклеазой также продемонстрировала свою неэффективность в отношении тРНК. Поэтому для удаления тРНК используют метод фракционирования по массе тотальной РНК на колонке. Вследствие этой процедуры удаляется большая часть РНК размером менее 100 нуклеотидов. Минус такой процедуры состоит в том, что при этом теряются некодирующие РНК в соответствующем диапазоне. Необходимо отметить, что существенное обеднение образца фракцией тРНК может быть достигнуто за счёт обработки РНКазой III в процессе фрагментации. РНКазы III активны в отношении РНК, имеющих шпильчатые структуры. Проблемой, возникающей в результате нормализации является искажение количественных данных относительно представленности транскриптов в образце.

В данной работе мы провели (совместно с А.Ю. Горбачёвым) сравнение разных методов нормализации и оценили эффективность удаления рРНК и тРНК, и их влияние на искажение количественных результатов. В качестве контроля использовались образцы тотальной РНК. В данной работе использовались следующие стратегии нормализации: гибридизация с зондами против рРНК с помощью коммерческого набора, обработка 5'-фосфат-зависимой экзонуклеазой с последующей гибридизацией с синтезированными зондами против рРНК *M. gallisepticum* S6 (рибоминус), нормализация библиотек кДНК 1 или 2 цикла нормализации с помощью дуплекс-специфической нуклеазы (ДСН).

Было установлено, что коммерческий набор для нормализации РНК неэффективен в отношении рРНК *M. gallisepticum*. Это потребовало создания зондов, оптимизированных непосредственно для работы с РНК *M. gallisepticum*. В процессе работы было обнаружено, что 5'-фосфат-зависимая экзонуклеаза неактивна в отношении 23S рРНК *M. gallisepticum*, в то время как количество 16S рРНК снижается при обработке в 10 раз (по результатам количественной ПЦР, 10 мкг тотальной РНК и 1 ед. 5'-фосфат-зависимой экзонуклеазы). Также было исследовано влияние на нормализацию предварительного фракционирования РНК на колонке.

Образец	Тип фрагментации	Удаление тРНК	Тип нормализации	Доля рРНК %	Доля тРНК %	Доля мРНК %
Лог. фаза (1)	РНКаза III	Нет	Тотальная РНК	92,9	3,5	1,3
Лог. фаза (2)	РНКаза III	Нет	Тотальная РНК	93,0	3,5	1,3
Лог. фаза (1)	РНКаза III	Нет	ДСН 1 раунд	83,0	2,8	5,6
Лог. фаза (2)	РНКаза III	Нет	ДСН 1 раунд	85,6	3,5	4,4
Лог. фаза (1)	РНКаза III	Нет	ДСН 2 раунда	42,2	7,3	43,8
Лог. фаза (2)	РНКаза III	Нет	ДСН 2 раунда	43,8	7,2	41,4
Лог. фаза (1)	ZnSO ₄	Нет	ДСН 1 раунд	83,0	6,0	1,6
Лог. фаза (2)	ZnSO ₄	Нет	ДСН 1 раунд	83,0	5,8	2,1
Лог. фаза (1)	ZnSO ₄	Колонка	ДСН 2 раунда	54,0	1,4	31,7
Лог. фаза (2)	ZnSO ₄	Колонка	ДСН 2 раунда	27,6	1,7	58,2
Лог. фаза	РНКаза III	Нет	Рибоминус	85,3	8,0	6,0

Таблица 2. Влияние метода нормализации и фрагментации на представленность кДНК разных классов РНК в транскриптомных библиотеках. Доля мРНК считалась как доля прочтений, картирующихся на кодирующие участки. Доля прочтений, картирующихся на межгенные участки и на кодирующие участки в антисмысловой ориентации не приведена.

Мы установили, что оптимальным методом нормализации является двукратная нормализация с помощью ДСН (Таблица 2). В таблице 4 видно, что один раунд ДСН приводит к удалению 10% рРНК, а два раунда – половины количества рРНК. Видно также, что доля тРНК в отсутствие специфического метода удаления возрастает во втором раунде ДСН. При этом мы выяснили, что при использовании химической фрагментации необходимо дополнительно удалять тРНК с помощью хроматографии. В таблице 4 видно, что при химической фрагментации и нормализации ДСН 1 раунд при прочих равных доля тРНК больше в два раза, что по существу сводит на нет эффект удаления рРНК. Нормализация по технологии «рибоминус» с использованием зондов против рРНК даёт результаты аналогичные однократной нормализации с помощью ДСН. Интересно, что нормализация с помощью метода рибоминус в итоге привела к сокращению количества рРНК на 10%, в то время как электрофоретический анализ показал отсутствие пиков рРНК после процедуры (Рисунок 7).

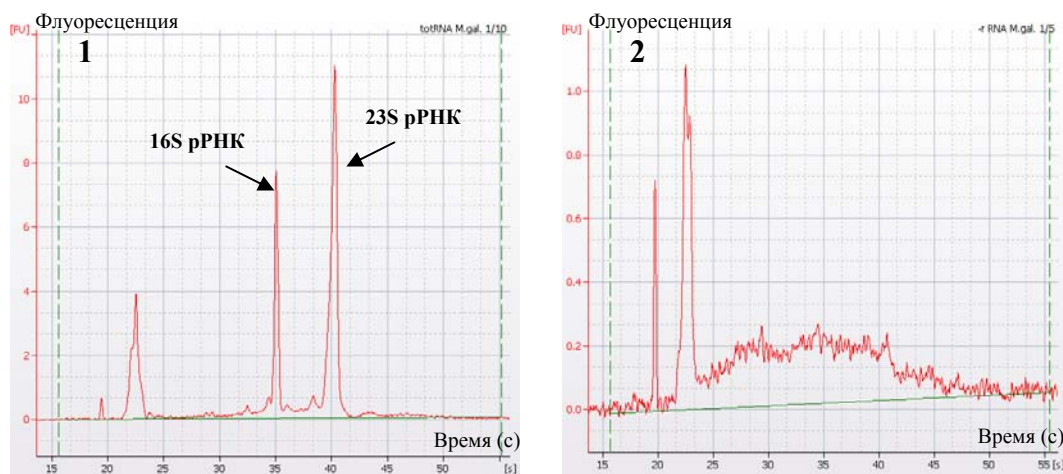


Рисунок 7. Профили электрофоретического разделения РНК до (1) и после (2) удаления рРНК с помощью метода рибоминус – гибридизации с зондами против рРНК. Видно, что пики рРНК исчезают.

Влияние метода нормализации на количественную представленность транскриптов показано на Рисунке 8. Из представленных данных видно, что нормализация с помощью ДСН приводит к минимальным искажениям по сравнению с нормализацией с помощью метода «рибоминус». Видно также, что

ко второму раунду существенно снижается представленность высококопийных транскриптов – рРНК и тРНК (соответственно на рисунке выделены красным и синим). В результате была признана оптимальной и выбрана для работы процедура нормализации, включающая фракционирование РНК с помощью хроматографии с отделением тРНК и последующее обеднение образца кДНК рРНК с помощью двух раундов гибридизации и обработки ДСН.



Рисунок 8. Влияние метода нормализации на количественную представленность транскриптов. В диаграмме представлена парная корреляция представленности транскриптов в разных библиотеках. По осям двоичный логарифм относительного покрытия генов. Tot1, Tot2 – образцы тотальной РНК, DSN11, DSN12 – образцы, нормализованные с помощью дуплекс-специфической нуклеазы 1 раунд, DSN21, DSN22 – образцы, нормализованные с помощью дуплекс-специфической нуклеазы 2 раунда, RM (рибоминус) – образец, нормализованный с помощью 5'-фосфат-зависимой экзонуклеазы и гибридизации с разработанным набором зондов против рРНК *M. gallisepticum* S6. Видно, что после двух раундов обработки ДСН снижается представленность высококопийных транскриптов – рРНК и тРНК (красные – рРНК, синие – тРНК, чёрные – кодирующие транскрипты). Нормализация с помощью метода рибоминус приводит к некоторому искажению представленности транскриптов. В целом нормализация 2 раунда с помощью ДСН приводит к минимальным искажениям количественных данных.

Искажение представленности транскриптов также может вноситься на уровне гибридизации и лигирования адаптеров. Это может привести к предпочтительному секвенированию фрагментов с определёнными последовательностями на концах. Было исследовано искажение представленности фрагментов в процессе секвенирования. В результате было обнаружено, что происходит более предпочтительное секвенирование фрагментов с GC-богатыми последовательностями на 5'-концах (Рисунок 9). При этом предпочтение в сторону какой-то определённой последовательности отсутствует.

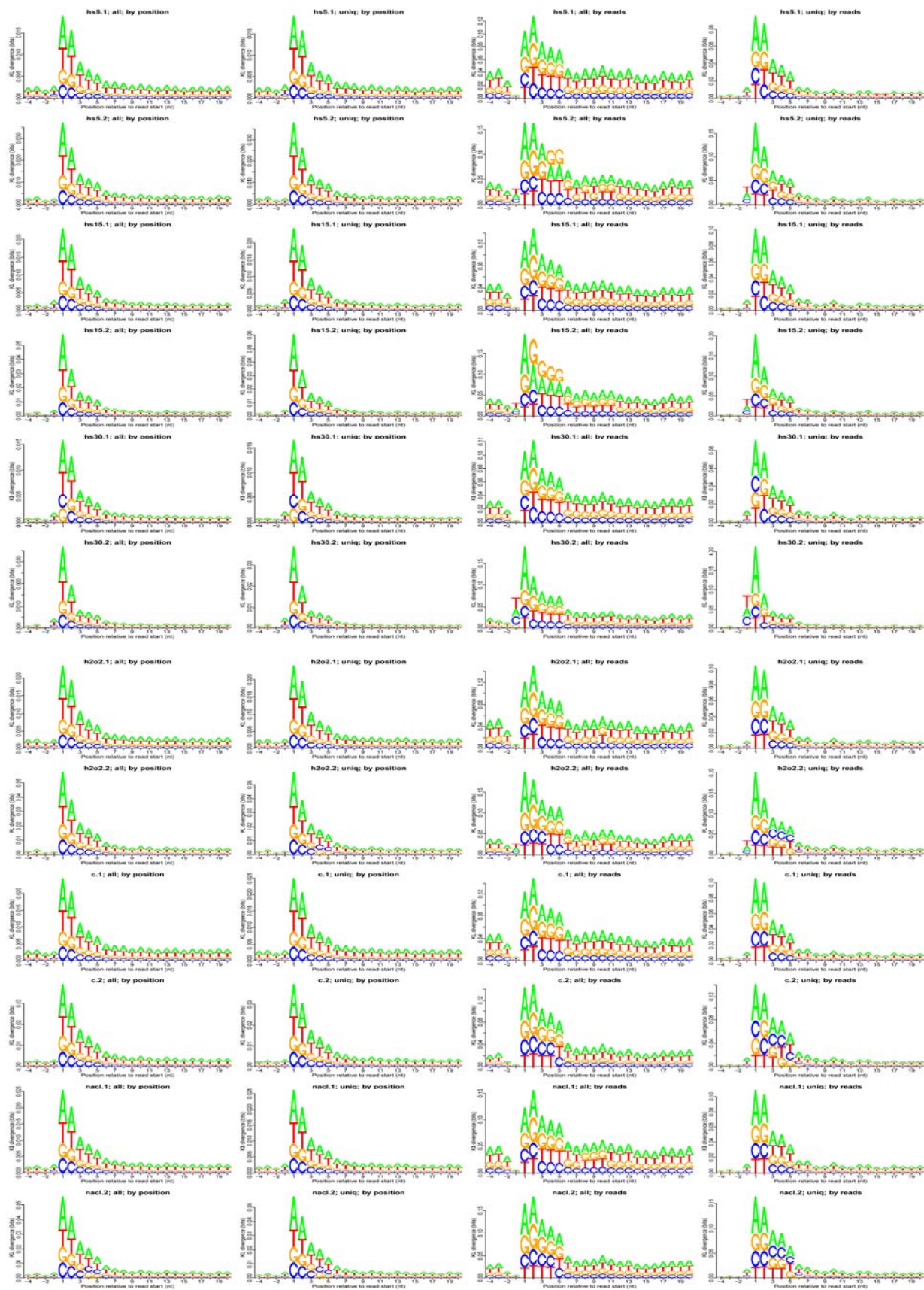


Рисунок 9. Искажение представленности транскриптов в процессе секвенирования. Происходит сдвиг представленности фрагментов в сторону фрагментов с GC-богатыми последовательностями на 5'-концах.

Воспроизводимость количественных данных по представленности транскриптов.

Для транскриптомных исследований были использованы клетки в следующих состояниях: логарифмическая фаза (контроль), тепловой стресс 5, 15 и 30 минут, солевой стресс, окислительный стресс, стационарная фаза, тепловой стресс в стационарной фазе. Эксперименты выполнялись в двух (или более) биологических повторах. Воспроизводимость транскриптомных данных оценивалась методом корреляции по Спирману (Рисунок 10). Полученные транскриптомные данные были валидированы для 98 генов с помощью количественной ПЦР в реальном времени (Рисунок 11, исходные данные по ПЦР в Приложении Таблица 8). Корреляция между данными, полученными с помощью секвенирования и ПЦР, как правило, составляла более 0,8.

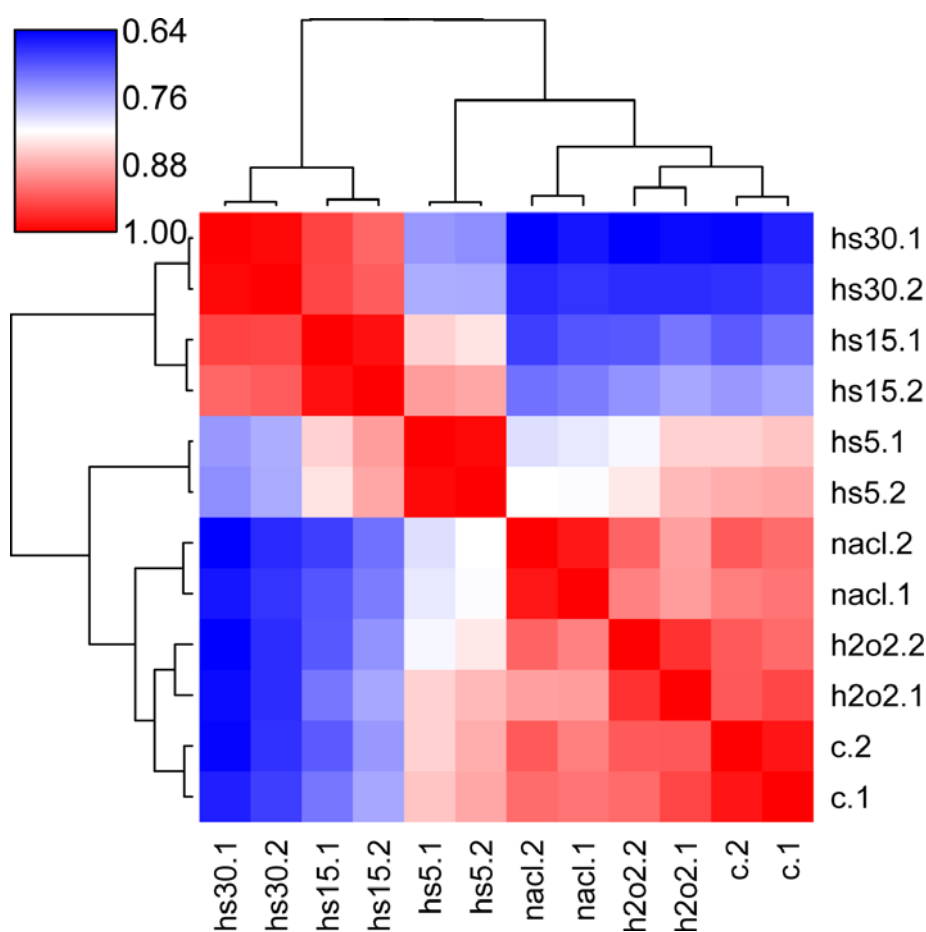


Рисунок 10. Корреляция количественных данных по Спирману между биологическими повторами в разных состояниях. Образцы: hs30 – тепловой стресс 30 мин, hs15 – тепловой стресс 15 мин, hs5 – тепловой стресс 5 мин, nacl – солевой стресс, h2o2 – окислительный стресс,

с – контроль, цифрами обозначены биологические повторы соответствующих состояний. Видно, что биологические повторы одного состояния чётко коррелируют друг с другом.

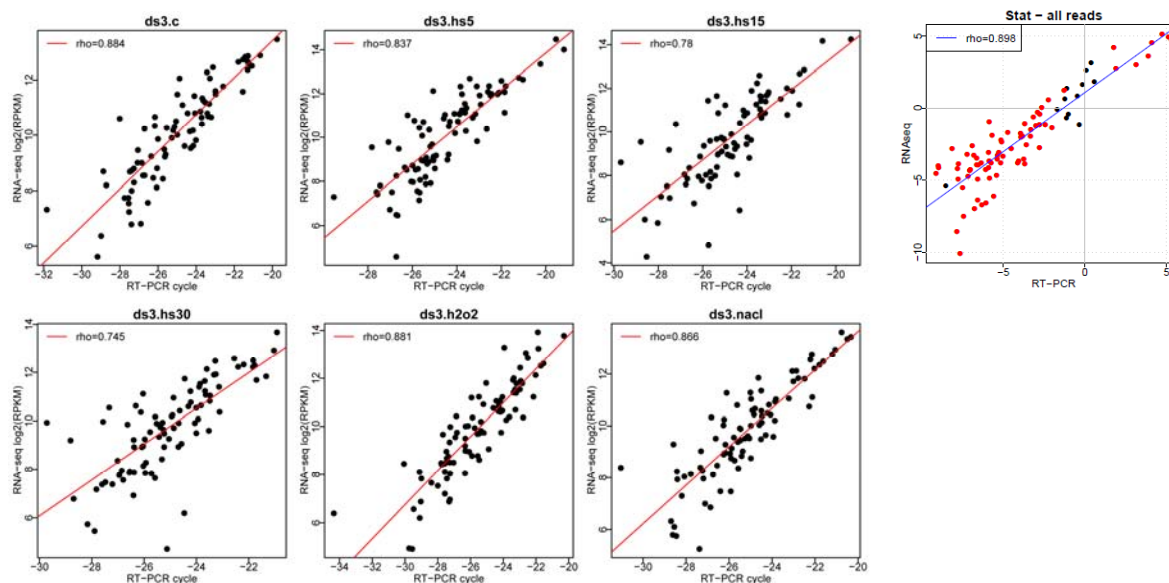


Рисунок 11. Валидация транскриптомных данных методом количественной ПЦР в реальном времени методом ранговой корреляции по Спирману, значение коэффициента корреляции приведено на каждом графике (ρ). По вертикальной оси – двоичный логарифм покрытия генов, по горизонтальной оси – нормированные (на 23S rРНК) циклы (C_t) количественной ПЦР. Для валидации использовались 98 генов, с уровнем экспрессии, перекрывающим возможный диапазон представленности транскриптов (динамический диапазон 17000 раз). Образцы: ds3.c – логарифмическая фаза, контроль, ds3.hs5 – тепловой стресс 5 мин, ds3.hs15 – тепловой стресс 15 мин, ds3.hs30 – тепловой стресс 30 мин, ds3.h2o2 – окислительный стресс, ds3.nacl – солевой стресс, Stat – стационарная фаза. Видно, что корреляция, как правило, составляет не менее 0,8.

Полногеномное картирование сайтов инициации транскрипции и структура промоторов M. gallisepticum

Для полногеномного картирования сайтов инициации транскрипции мы (совместно с П.В. Мазиным) разработали технологию обогащения библиотек 5'-концевыми последовательностями РНК (см. Материалы и Методы). Картирование сайтов инициации транскрипции с помощью 5'-обогащённых библиотек проводилось для двух состояний – логарифмической фазы роста и теплового стресса.

В процессе приготовления 5'-обогащённых библиотек сохраняется информация о направлении транскрипта. Таким образом, возможно установить не

только наличие старта транскрипции, но и её направление. Покрытие в 5'-обогащённых библиотеках по понятным причинам отличается от покрытия, получаемого в ходе направленного секвенирования. В 5'-обогащённых библиотеках прочтения, относящиеся к сайтам инициации транскрипции, образуют «стопки», т.е. концентрируются возле определённой позиции (Рисунок 12). Такие «стопки» далее будут называться пиками (в покрытии).

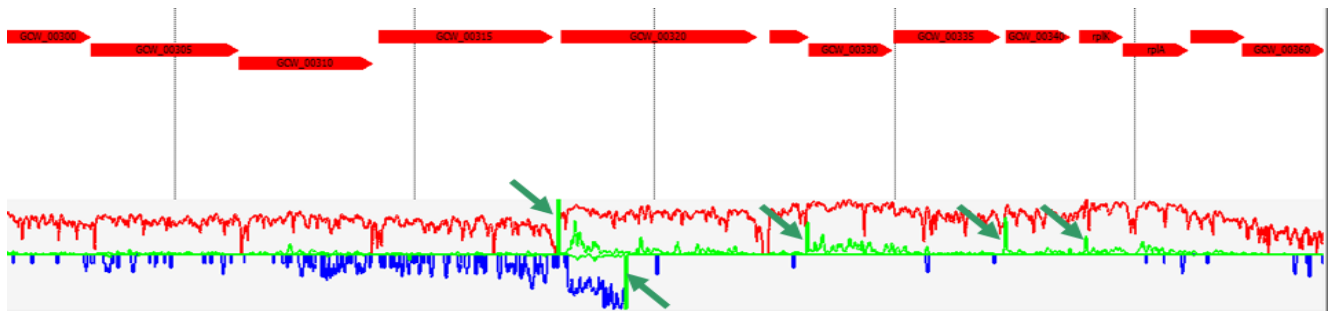


Рисунок 12. Пример покрытия, получаемого в ходе транскриптомного анализа. Сверху идёт разметка генома (красным). Красным и синим обозначено покрытие в стандартных библиотеках по плюс и минус цепям соответственно. Зелёным обозначено покрытие в 5'-обогащённых библиотеках. Вверх направлены пики по плюс цепи, вниз – по минус. Видны пики, соответствующие сайтам инициации транскрипции (обозначены стрелками). Также виден антисмысловый транскрипт в гене GCW_00320 и его сайт инициации транскрипции. Покрытие по каждой цепи (вертикальная шкала) нормализовано к максимальному покрытию по данной цепи, шкала двоичная логарифмическая, цена деления горизонтальной шкалы – 2,5 КБ.

В ряде случаев пики могут иметь плечи, соответствующие, по-видимому, альтернативным точкам инициации с одного промотора. При этом в таких библиотеках имеется шум, вызванный неполным расщеплением не 5'-концевых фрагментов. Высота пика, в целом, коррелирует с количеством исходного транскрипта. Точно так же высоко представленные транскрипты, по понятным причинам, дают больше шума по сравнению с низкокопийными. В силу этого для поиска пиков в покрытии используется алгоритм поиска локальных максимумов в покрытии. В качестве минимальной пороговой высоты пика было выбрано 10 ридов. Для дальнейшего анализа выбирались пики, присутствующие одновременно в двух библиотеках – контроль или тепловой стресс.

Пики, получаемые в результате секвенирования 5'-обогащённых библиотек могли быть результатом предпочтительного лигирования адаптеров или переамплификации, а не соответствовать реальным 5'-концам РНК. Для проверки

этого был проведён поиск какого-либо мотива в начале прочтений (т.е. после точки лигирования). Результаты представлены на Рисунке 13. Было установлено, что каких-либо предпочтительных мотивов в 5'-обогащённых библиотеках не существует, а распределение частот встречаемости нуклеотидов аналогично таковому в обычных библиотеках, т.е. имеет место предпочтение в лигировании адаптеров к ГЦ-богатым фрагментам.

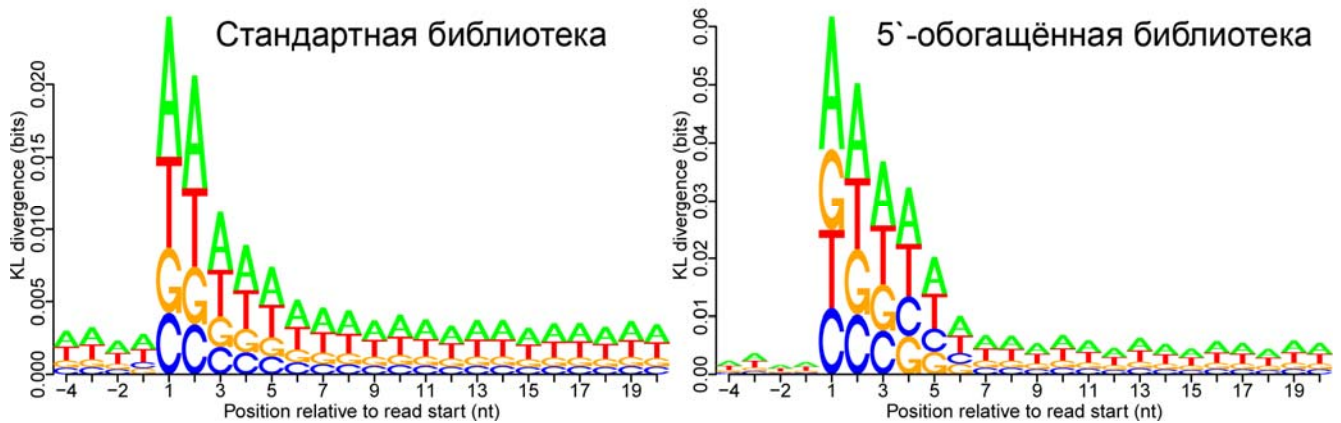


Рисунок 13. Сравнение искажения представленности транскриптов, вносимого в ходе секвенирования, в стандартных и 5'-обогащённых библиотеках. Диаграмма дивергенции Кульбаха-Лейблера для 5'-концевых областей прочтений и соответствующих участков генома перед ними. Позиции 1 соответствует первый нуклеотид прочтения. В обоих случаях повышена представленность транскриптов с ГЦ-богатыми 5'-концевыми последовательностями, однако разницы в характере вносимого искажения не наблюдается.

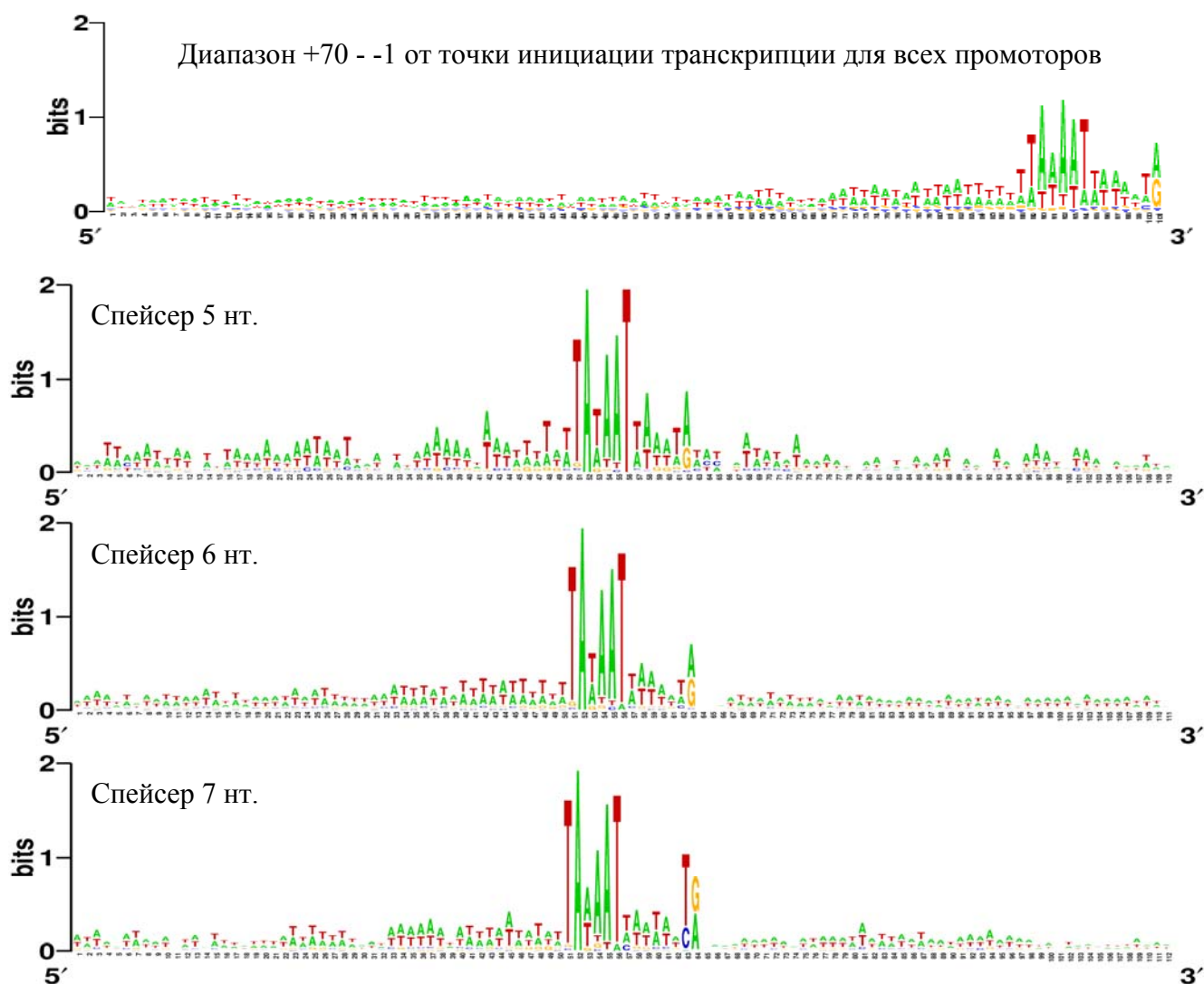


Рисунок 14. Строение промоторов со спейсерами разной длины. В начале приведена диаграмма встречаемости нуклеотидов в диапазоне +70 - -1 от точки инициации транскрипции для всех промоторов без деления по длине спейсера. Далее диапазон +50- -50 с учётом длины спейсера. Оптимальным иницирующим нуклеотидом является А или G. В том случае если длина спейсера составляет 7 нт. на предпочтительном положении в 6 нт. находится неоптимальный иницирующий нуклеотид Т или С.

Выравнивание последовательностей перед пиками сразу позволило нам идентифицировать консервативный элемент, соответствующий ТАТА-боксу. В силу того, что геном *M. gallisepticum* является АТ-богатым, нахождение ТАТА-бокса с высоким скором на определённом расстоянии от некоторой выбранной позиции в геноме может быть вероятным событием. Как следствие, ТАТА-бокс может находится возле пика при условии, что пики происходят от случайно отсеквенированных фрагментов РНК, а не от 5'-концевых фрагментов. Для проверки было исследовано распределение весов ТАТА-боксов в зависимости от положения относительно пика в 5'-обогащённой библиотеке. В результате было

обнаружено, что ТАТА-боксы с максимальными весами расположены на расстоянии 12 (6 нт. спейсер, предпочтительно), -11 (5 нт. спейсер) и -13 (7 нт. спейсер) от пика (Рисунок 15). Анализ структуры промоторов со спейсерами разной длины выявляет, что оптимальным иницирующим нуклеотидом является А или G. В том случае если длина спейсера составляет 7 нт. на предпочтительном положении в 6 нт. находится неоптимальный иницирующий нуклеотид Т или С (Рисунок 14). Только в 5% идентифицированных промоторов транскрипция начинается с неоптимального нуклеотида.

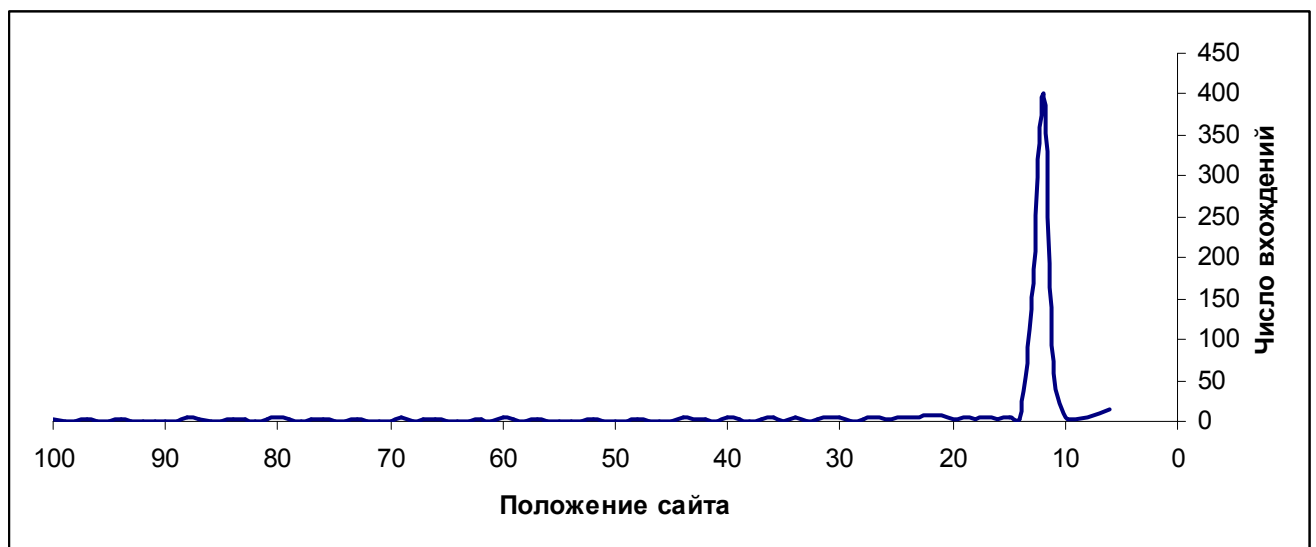


Рисунок 15. Положение лучшего вхождения весовой матрицы (PWM) ТАТА-бокса для 829 лучших пиков в 5'-обогащённых библиотеках. Координата положения – координата первой позиции матрицы относительно первой позиции пика. Длина матрицы – 6 позиций (ТАТААТ). Максимум приходится на положения 11-13, что соответствует спейсеру длиной 5-7 нуклеотидов. Предпочтительным является спейсер в 6 нуклеотидов. Нулевое положение соответствует первой позиции пика.

В ходе анализа пики приписываются к генам. В самом простом случае приписывание происходит по принципу близости к гену. У одного гена может быть больше одного сайта инициации транскрипции. В таком случае пик с наибольшей высотой считается основным. В ходе дальнейшего анализа сайты инициации транскрипции приписываются транскрипционным единицам (подробно рассмотрено ниже в соответствующей секции). Всего в результате картирования было идентифицировано 828 сайтов инициации транскрипции. Из

них 324 были идентифицированы как основные, т.е. находились вблизи гена и имели максимальное локальное покрытие. При этом ген может иметь более одного сайта инициации транскрипции. Также некоторое количество промоторов относится к некодирующим транскриптам.

Для *M. gallisepticum* в состоянии теплового стресса было проведено дополнительное картирование промоторов (см. подраздел Транскрипционный ответ *M. gallisepticum* на стрессовые воздействия). Было проведено исследование корреляции между относительным покрытием генов и высотой основных пиков, приписанных к ним в 5'-обогащённых библиотеках и изменением высоты пика и относительного покрытия в тепловом стрессе. В результате корреляция по Спирману между высотой пика и относительным покрытием приписанного гена составила 0,4, а корреляция между изменением высоты пика и относительного покрытия гена составила 0,55 ($p > 0,01$, Рисунок 16).

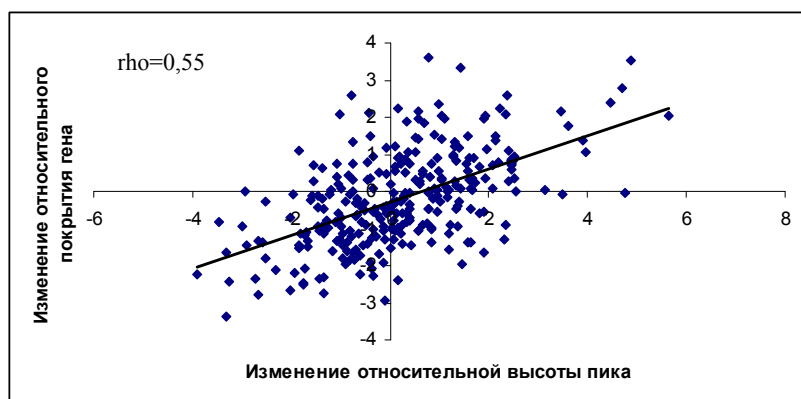


Рисунок 16. Корреляция между изменением относительной высоты пика в 5'-обогащённой библиотеке и изменением относительного покрытия соответствующего гена (контроль против теплового стресса, только для пиков, приписанных к определённым генам). Коэффициент корреляции составляет 0,55.

Аннотация генома *M. gallisepticum* выявляет только один (основной) сигма-фактор. Также находится один гипотетический альтернативный сигма-фактор. Доменная структура основного сигма-фактора позволяет предположить, что он связывает промоторы в которых могут быть -10-бокс, -35-бокс и EХТ-элемент (Рисунок 17). Домен, отвечающий за связывание Dis-элемента (дискриминатора) отсутствует. В отличие от сигма-факторов *E. coli* и *B. subtilis* сигма-фактор *M. gallisepticum* имеет дополнительный протяжённый участок с неизвестной

функцией. На основе структуры сигма-фактора можно предположить, что он может связывать какой-то мотив, расположенный после -10-бокса.

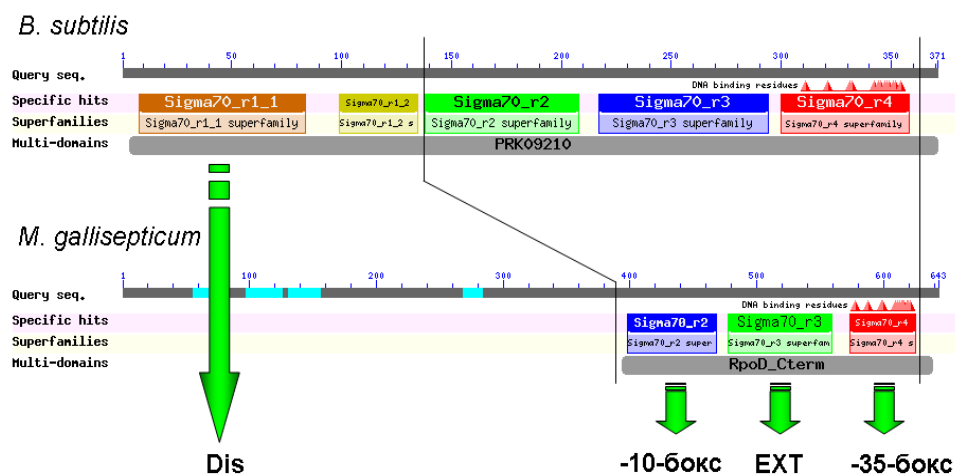


Рисунок 17. Сравнение доменной структуры сигма-факторов *B. subtilis* и *M. gallisepticum* на основе данных NCBI CDD (базы данных консервативных доменов). У *M. gallisepticum* присутствуют домены, связывающие -10-бкс, -35-бкс и EXT-элемент. Отсутствует домен, связывающий Dis-элемент (дискриминатор), а также регион 1.2. Вместо этого имеется протяжённый участок с неизвестной функцией и участками с регулярными аминокислотными последовательностями (выделены голубым).

Промоторы *M. gallisepticum* имеют два описанных консервативных элемента – ТАТА(-10)-бкс и EXT-элемент (Рисунок 18). При этом EXT-элемент присутствует, как правило, только у сильных промоторов. В отличие от *E. coli* и *B. subtilis* у *M. gallisepticum* не было найдено никаких признаков существования -35-бокса.

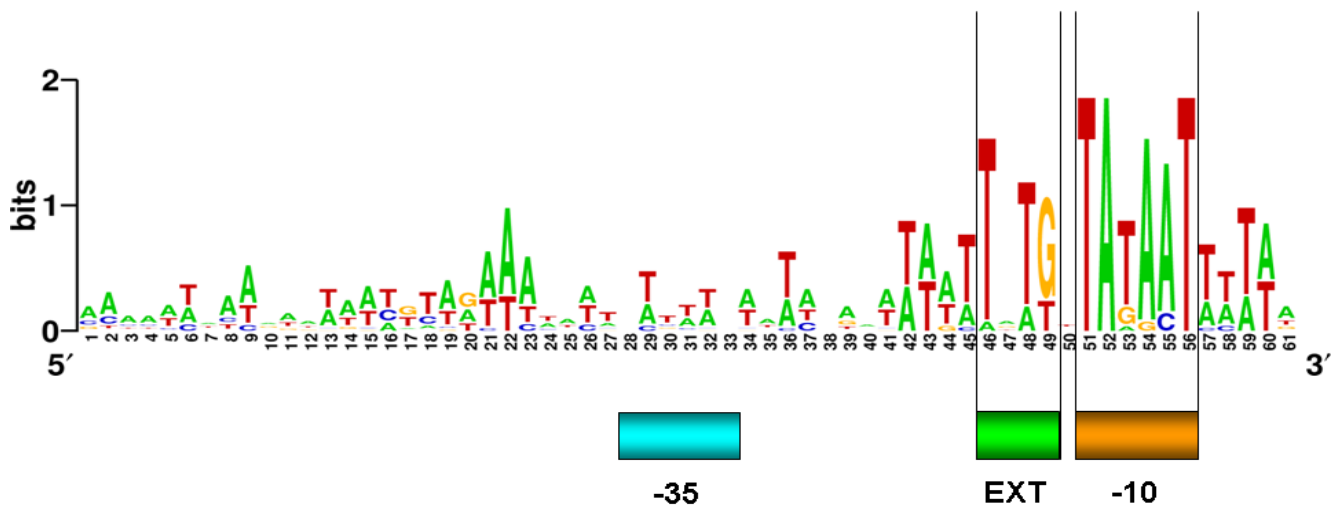


Рисунок 18. Строение сильного промотора *M. gallisepticum*. Для построения лого использовались промоторы рРНК и тРНК. Присутствуют два основных консервативных элемента: -10-бокс и EXT-элемент (extended -10). EXT-элемент имеет консенсус TRTG, что соответствует таковому у Грам-положительных бактерий. Видно, что -35-бокс отсутствует. Для промоторов *M. gallisepticum*, по-видимому, является важным окружение кор-промотора, состоящее из АТ-богатых участков.

Организация транскрипционных единиц в геноме *M. gallisepticum*

Для первоначального определения сайта связывания рибосомы у *M. gallisepticum* были взяты последовательности длиной 25 нуклеотидов перед всеми открытыми рамками считывания. Эти последовательности использовались для поиска мотивов с помощью онлайн-сервиса MEME. На основе этих данных была сконструирована матрица для поиска. Также было установлено, что последовательность из максимумов встречаемости нуклеотидов в такой матрице комплементарна последовательности на 3'-конце 16S рРНК. Затем было исследовано распределение позиций лучшего вхождения матрицы в пределах 100 нуклеотидов перед всеми открытыми рамками считывания.

Сайт связывания рибосомы у *M. gallisepticum* гомологичен таковому у *E. coli*. При этом, однако, между ними есть отличия. Сайт связывания рибосомы *M. gallisepticum* длиннее и смещён ближе к 3'-концу рРНК (Рисунок 19). Как и для *E. coli* у *M. gallisepticum* сайт связывания рибосомы комплементарен последовательности на 3'-конце 16S рРНК (1511-1518). Распределение лучших вхождений сайта связывания рибосомы (Рисунок 20) показывает, что размер оптимального спейсера между ним и старт-кодоном составляет 6-7 нуклеотидов,

при этом, в отличие от промотора, диапазон допустимых длин спейсера для сайта связывания рибосомы шире и составляет около 5-12 нуклеотидов. Для *E. coli* оптимальная длина спейсера – 8 нуклеотидов.



Рисунок 19. Строение сайта связывания рибосомы *M. gallisepticum*.

А. Лого сайта связывания рибосомы *M. gallisepticum*. Комплементарная последовательность в 16S рРНК, связывающая этот сайт CTCCTTTC (1511-1518).

В. Сравнение сайтов связывания рибосом *E. coli* и *M. gallisepticum* и обратной комплементарной последовательности 16S рРНК *M. gallisepticum*. Последний консервативный нуклеотид G присутствует у *M. gallisepticum*, но не важен для связывания.

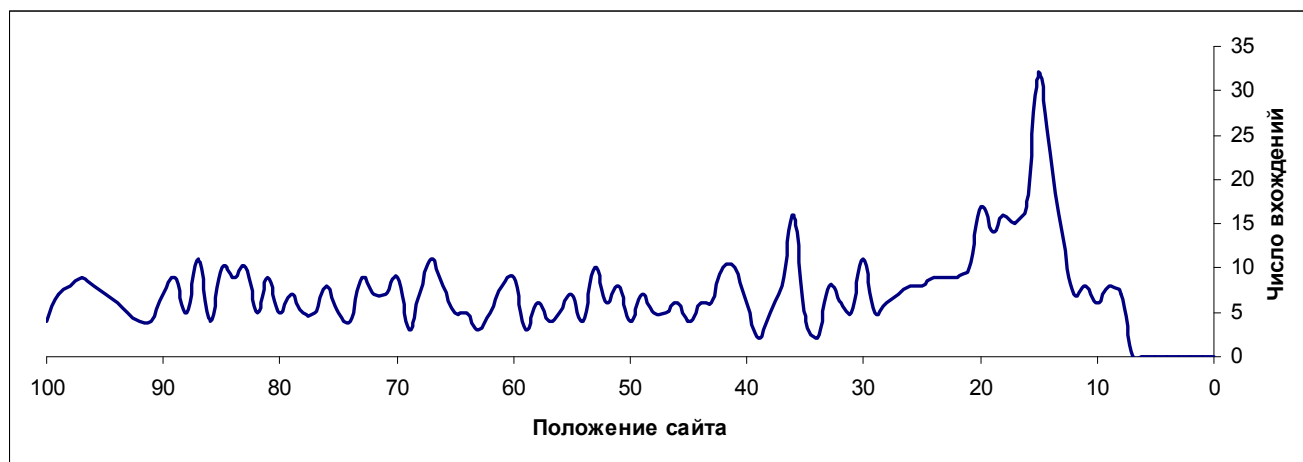


Рисунок 20. Положение лучшего вхождения весовой матрицы (PWM) сайта связывания рибосомы для всех аннотированных открытых рамок считывания в геноме *M. gallisepticum*. Координата положения – координата первой позиции матрицы. Длина матрицы – 8 позиций (GAAAGGAG). Максимум приходится на положения 14-15, что соответствует спейсеру длиной 6-7 нуклеотидов. Нулевое положение соответствует старт-кодону.

На основе данных по разметке сайтов инициации транскрипции можно вычислить длины 5'-нетранслируемых регионов мРНК. Соответствующие результаты показаны на Рисунке 21. Порядка 50% 5'-нетранслируемых областей находятся в диапазоне длин 0-50 нуклеотидов. Максимум приходится на длину в

14 нуклеотидов, что согласуется с максимумом распределения положений сайта связывания рибосомы – 14-15 нуклеотидов до старт-кодона. Существует также некоторое количество (9%) сайтов инициации транскрипции, которые стоят после соответствующего старт-кодона. Такое явление может быть связано с тем, что трансляция таких генов начинается со следующего старт-кодона.

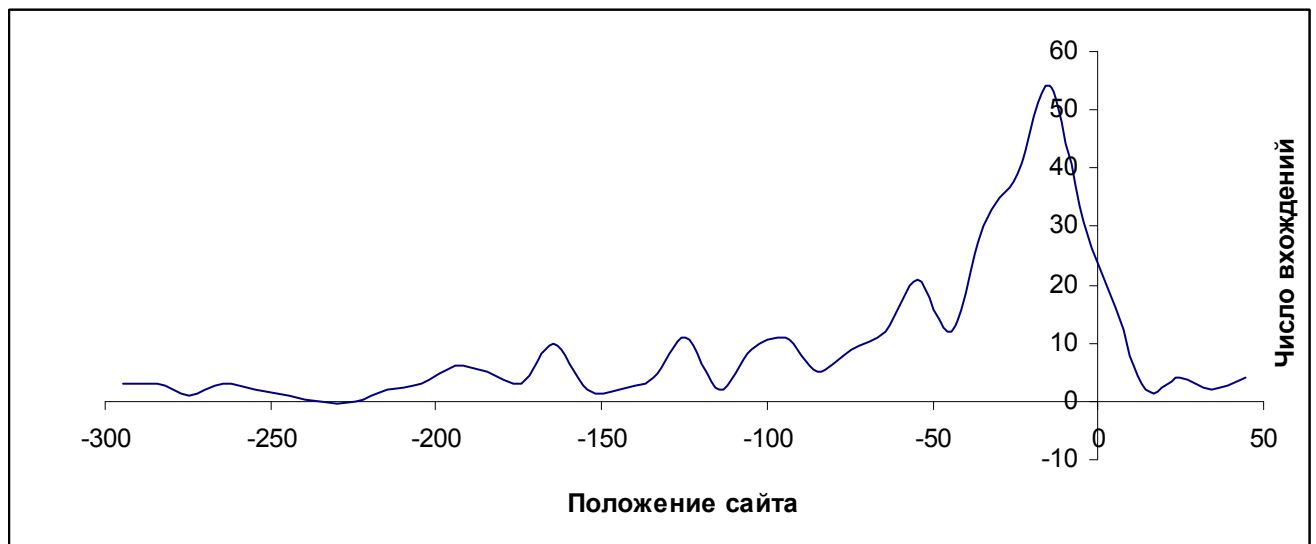


Рисунок 21. Положение сайта инициации транскрипции относительно старт-кодона. Длина 50% 5'-нетранслируемых областей находится в диапазоне 0-50 нуклеотидов. Максимум приходится на длину в 14 нуклеотидов. Небольшое число сайтов инициации транскрипции (9%) находятся после старт-кодона, что, по-видимому, связано с тем, что трансляция начинается не с аннотированного, а со следующего старт-кодона.

Обобщая вышесказанное относительно системы экспрессии генов *M. gallisepticum* можно сделать вывод, что промоторы *M. gallisepticum* включают в себя консервативный ТАТА-бокс, причём оптимальными последовательностями являются ТАТААТ или ТААААТ. Также сильные промоторы могут иметь дополнительный EXT-элемент, с последовательностью TATG или TGTG оптимальное расстояние между EXT-элементом и ТАТА-боксом составляет 1 пару оснований. Для оптимального промотора также важно локальное АТ-богатое окружение. Оптимальный спейсер между ТАТА-боксом и точкой инициации транскрипции составляет 6 пар оснований. Оптимальный иницирующий нуклеотид – А или G. Оптимальная длина 5'-нетранслируемого региона в мРНК составляет от 10 до 50 нуклеотидов. Оптимальный участок связывания рибосомы

соответствует модифицированной последовательности Шайна-Дальгарно и его последовательность GAAAGGAG. Оптимальное расстояние между участком связывания рибосомы и старт-кодоном составляет 6-7 нуклеотидов.

Разметка оперонов в геноме *M. gallisepticum* включала два этапа. Вообще говоря, опероном является область генома, с которой считывается непрерывный транскрипт. Поскольку детектирование полноразмерных транскриптов с помощью высокопроизводительного секвенирования невозможно, непрерывность покрытия не обязательно означает наличие непрерывного транскрипта, перекрывающего всю область непрерывного сигнала. Возможно наличие внутренних промоторов и терминаторов, при котором в реальности с данного участка генома считываются несколько перекрывающихся РНК. В результате на первом этапе было проведено картирование непрерывно покрытых областей генома. Это позволило выявить 331 непрерывно экспрессирующийся участок, включая антисмысловые РНК. Далее было обнаружено, что в рамках непрерывно покрытых участков наблюдается «лестничная» транскрипция (Рисунок 22), т.е. в рамках непрерывно покрытых регионов имелись регионы с разной величиной покрытия. Абсолютное большинство таких участков транскрибирующихся со смысловой цепи содержат в себе один или несколько кодирующих областей, а также короткие не кодирующие участки до и после кодирующей области, что соответствует 5'- и 3'-UTR областям РНК. По-видимому, в *M. gallisepticum* оперонная структура устроена гораздо сложнее классических представлений об оперонной организации бактериальных геномов. Похожий результат также был получен Serrano и др. на *M. pneumoniae* [20].

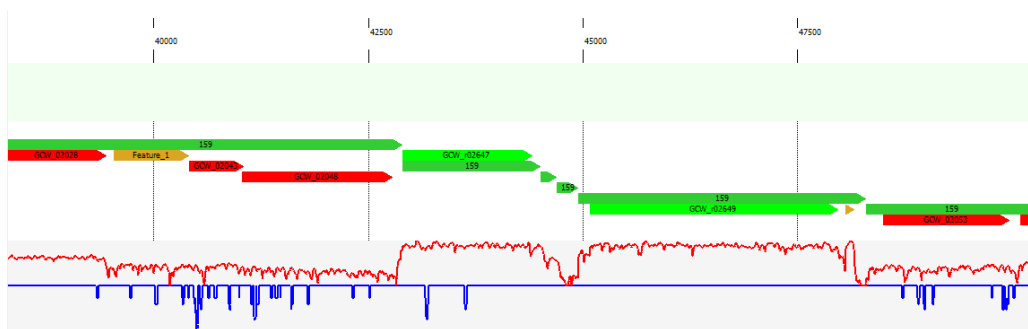


Рисунок 22. «Лестничная» экспрессия непрерывно покрытых областей. Красная линия – покрытие по плюс-цепи, синяя – по минус-цепи, сверху – разметка, тёмно-зелёным обозначены области с одной величиной покрытия, картированные по итогам разметки оперонной структуры, красным – кодирующие участки.

Некодирующие РНК в геноме *M. gallisepticum*

Некодирующие РНК представляют собой довольно разнообразную группу. Сюда относятся как цис-, так и транс-действующие антисмысловые РНК. Функции многих некодирующих РНК на сегодняшний день непонятны, хотя у разных бактерий их открыто достаточно много. Среди антисмысловых транскриптов *M. gallisepticum* существуют такие, которые целиком находятся внутри кодирующих генов в антисмысловой ориентации, так и те, которые частично с ними перекрываются. В транскриптоме *M. gallisepticum* нами было обнаружено 32 антисмысловых РНК, при условии, что такие РНК лежат целиком внутри кодирующих последовательностей и составляют не менее 100 нуклеотидов в длину (Приложение, Таблица 7).

Наибольшие изменения в антисмысловой транскрипции происходят в тепловом стрессе. В этом состоянии увеличивают транскрипцию 15 антисмысловых РНК, а 7 её снижают. При этом снижение транскрипции происходит преимущественно в начале теплового стресса, а увеличение через 15 минут. Увеличение антисмысловой транскрипции происходит в следующих генах: белка семейства сериновых протеаз, хеликазы семейства SNF2, металл-зависимой фосфогидролазы, аминокислотной пермеазы, 5'-3' экзонуклеазы, АТФ-азы Р-типа транспорта катионов, аспарагин-лигазы А, мембранной метилазы, цитадгезина Hlp2, гемагглютинин семейства VlhA, ацетат киназы и ещё в четырёх генах с неизвестной функцией. Уменьшение антисмысловой транскрипции происходит в генах бета субъединицы АТФ-синтетазы F0F1-типа,

гемагглютинаина семейства VlhA, пермеазы и четырёх генах с неизвестной функцией.

В окислительном стрессе происходит увеличение транскрипции антисмысловых РНК в генах шаперона семейства DnaJ и белка с неизвестной функцией. Уменьшение транскрипции антисмысловой РНК наблюдается в одном гене с неизвестной функцией. В осмотическом стрессе происходит увеличение транскрипции антисмысловых РНК в генах шаперона семейства DnaJ, ацетат киназы и белка с неизвестной функцией. Снижение антисмысловой транскрипции происходит в одном гене белка с неизвестной функцией.

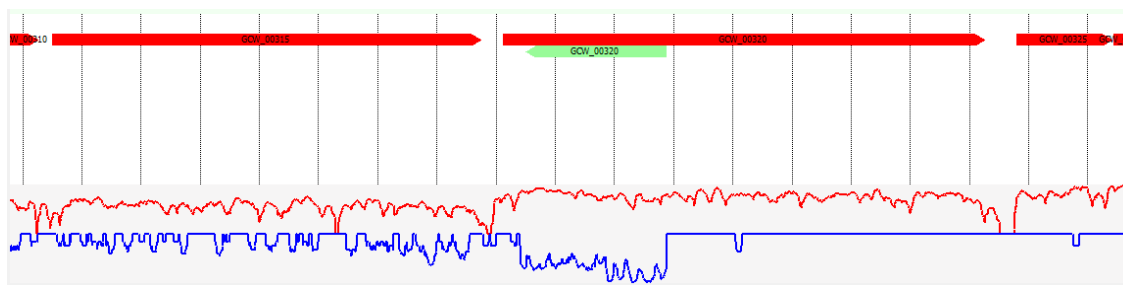


Рисунок 23. Пример антисмысловой РНК *M. gallisepticum*. Сверху приведена разметка генома, красным обозначены открытые рамки считывания, зелёным – антисмысловая РНК. Ниже приведено покрытие по плюс (красный) и по минус (синий) цепям.

Транскрипционный ответ M. gallisepticum на стрессовые воздействия

Транскриптомный анализ *M. gallisepticum* был проведён в следующих состояниях: логарифмическая фаза, стационарная фаза, тепловой стресс в логарифмической фазе, окислительный стресс, осмотический стресс и тепловой стресс в стационарной фазе. Как в ходе подбора условий, так и по результатам транскрипционного профилирования было установлено, что фаза роста оказывает решающее воздействие на характер стрессового ответа. В стационарной фазе стрессовый ответ, по существу, отсутствует. В дальнейшем тепловой стресс будет упоминаться в контексте логарифмической фазы, если не оговорено особо. В качестве критериев изменения экспрессии был использован порог достоверности $q\text{-value} < 0,05$ и амплитуда изменения больше двух раз.

Среди всех типов стресса наиболее сильный транскрипционный ответ, как по амплитуде, так и по числу задействованных генов наблюдался при тепловом

стрессе. В связи с этим для теплового стресса также была отснята кинетика ответа в точках 5 (Приложение, Таблица 1), 15 (Приложение, Таблица 2) и 30 (Приложение, Таблица 3) минут. В ходе теплового стресса наблюдается увеличение количества задействованных генов с 171 (54 увеличивают транскрипцию) до 363 (173 увеличивают транскрипцию). Гены были кластеризованы на основе паттернов кинетики ответа на тепловой стресс (Рисунок 24). В целом, можно выделить четыре основных типа ответа: быстрое увеличение транскрипции (максимум в точке 5 мин, 33 гена) с последующим выходом на плато или некоторым падением, постепенное увеличение транскрипции (максимум в точке 30 мин, 158 генов), быстрое падение транскрипции (минимум в точке 5 мин, 63 гена) и постепенное падение (минимум в точке 30 мин, 178 генов). Существует также некоторое число генов, не попадающих в один из этих типов. Можно предположить, что быстрые изменения связаны с регуляцией с помощью транскрипционных факторов, предсуществующих в клетке, в то время как постепенные изменения могут иметь в своей основе механизм глобальной регуляции или зависеть от синтеза транскрипционных факторов *de novo*. Также, тот факт, что генов, быстро увеличивающих транскрипцию, относительно мало, говорит в пользу того, что они регулируются с помощью специфических транскрипционных факторов.

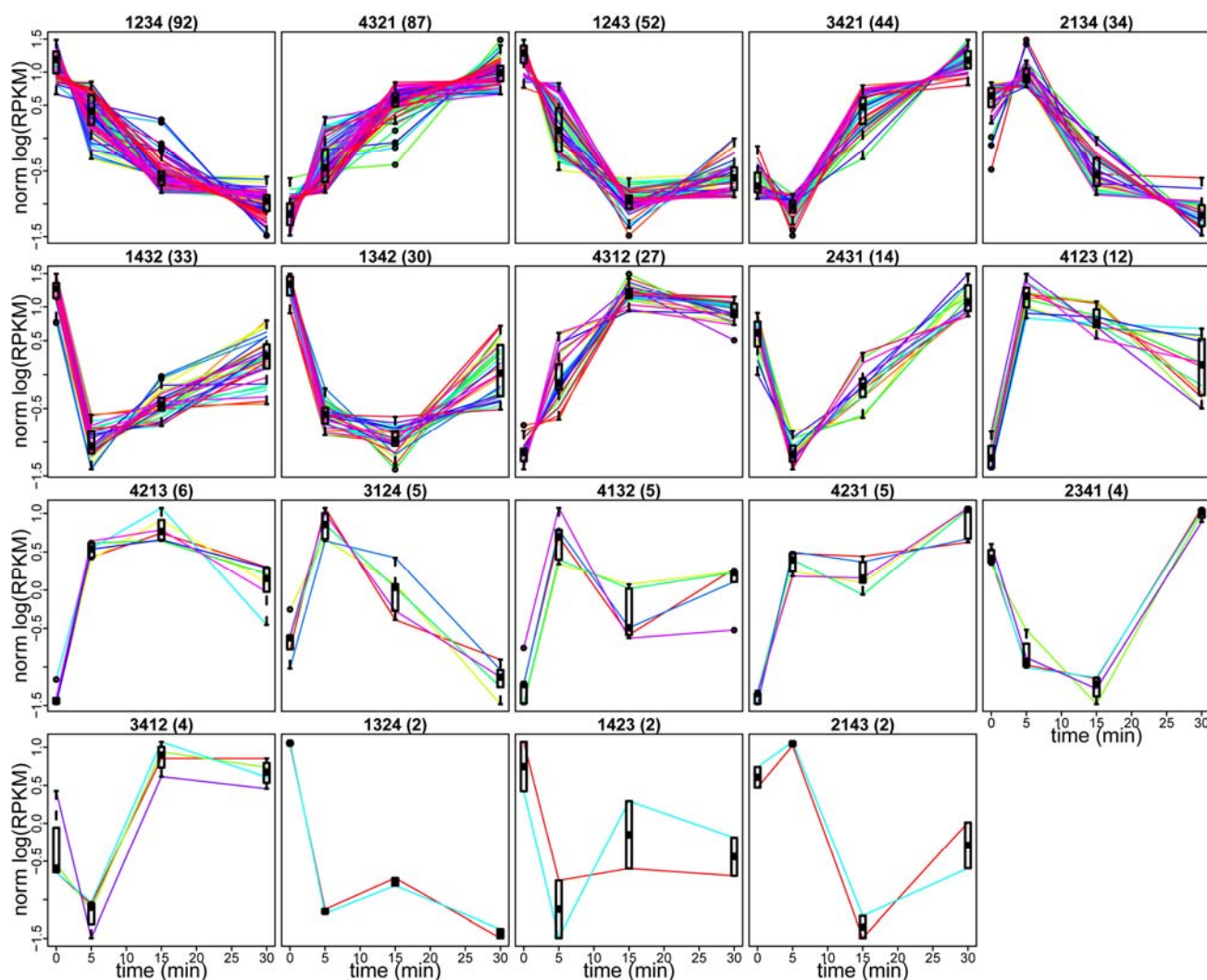


Рисунок 24. Паттерны изменения экспрессии генов *M. gallisepticum* при ответе на тепловой стресс.

В геноме *M. gallisepticum* аннотирован регулятор ответа на тепловой стресс HrcA, являющийся единственным транскрипционным фактором с известным механизмом действия и сайтом связывания (CIRCE). Поиск CIRCE по геному *M. gallisepticum* выявил 5 таких сайтов в промоторах генов шаперонов *clpB*, *lon*, *dnaK*, *dnaJ_2*, *dnaJ_3a* (GCW_01625). Из них *dnaJ_2* – гомолог *dnaJ* *E. coli*, участвующий в нормальном фолдинге и ответе на тепловой стресс, а *dnaJ_3a* является его укороченной копией. Кроме него в данном месте генома также стоят гены GCW_01620 и GCW_01615, также являющиеся укороченными гомологами *dnaJ*. Все три являются результатом деления полноразмерного *dnaJ* на три рамки. Транскрипционный анализ показывает, что все они транскрибируются как один транскрипт. В силу собственной симметрии, CIRCE также попадает в

промоторную область гена GCW_03728 (мембранный липопротейн). В результате в геноме есть не более 6 генов, для которых существует известный механизм ответа на тепловой стресс.

Гены, увеличивающие транскрипцию в ходе теплового стресса, относятся к разным функциональным группам. Среди них можно выделить гены шаперонов, субтилизиновых протеаз (не относимые к шаперонам), каналов и транспортёров, белков репарации ДНК, ферритиновых белков, белков кластера деления, метаболических ферментов, рибосомальных белков и факторов трансляции, а также большое количество генов белков с неизвестной функцией (65 в 30 минутном стрессе). Для генов с CIRCE в промоторах происходит увеличение транскрипции *clpB*, *lon*, *dnaK* и *dnaJ_3b*. При этом увеличение *dnaJ_2* наблюдается, но не проходит порогового значения. Интересно, что у гена *dnaJ_2* имеется второй промотор, расположенный за 214 п.о. до CIRCE-зависимого промотора. При этом основным промотором является не CIRCE-зависимый. Транскрипция GCW_03728 не зависит от CIRCE.

Помимо CIRCE-контролируемых генов шаперонов, в тепловом стрессе задействованы гены других шаперонов. К ним относятся гомологи *dnaJ* – *dnaJ_6* и *dnaJ_7*. При этом гены шаперонов *groEL* и *groES*, а также *grpE* не участвуют в ответе на тепловой стресс.

В ходе ответа на тепловой стресс происходит увеличение транскрипции пяти генов сериновых протеаз семейства субтилизина, а также ассоциированных с ними генов мембранных белков с неизвестной функцией. Соответствующие гены расположены в трёх разных оперонах. Для теплового стресса характерно увеличение экспрессии протеаз. Так, увеличивается транскрипция протеазы *lon*. У бактерий с большим размером генома также имеются протеазы Clp-семейства, отсутствующие у микоплазм. В связи с этим субтилизиновые протеазы могут играть роль в утилизации повреждённых стрессом белков. С другой стороны, эти протеазы имеют предсказанные трансмембранные домены и, вследствие их топологии, располагаются на внешней поверхности мембраны (Рисунок 25). Вследствие этого они либо специализированы для утилизации повреждённых

мембранных белков, либо участвуют в специфическом ответе на стресс, связанном с деградацией поверхностных антигенов (подробно рассмотрено далее).

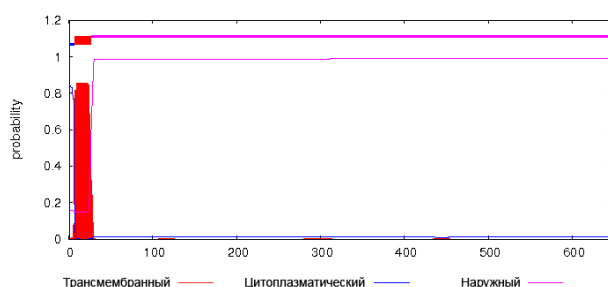


Рисунок 25. Мембранная локализация доменов в сериновых протеазах семейства субтилизина *M. gallisepticum*. Красным выделена предсказанная трансмембранная часть.

В процессе теплового стресса увеличивается транскрипция генов каналов и транспортёров. Сюда входят гены ABC-транспортёра *hatA*, *hatB*, *hatC*, ABC-транспортёр MdlB-типа, ABC-транспортёр сахаров, глюкозо-специфичная и две маннитол-специфичные субъединицы PTS-системы (фосфоенол-пируват зависимой системы транспорта сахаров), механочувствительный канал высокой проводимости и гипотетический ионный канал, катионный транспортёр GCW_03418, ABC-транспортёры неизвестной специфичности (GCW_02814 и GCW_02819, GCW_01300 и GCW_01305) и два гена β -субъединицы АТФ-синтазы F0F1-типа. Видно, что происходит увеличение транскрипции генов транспортёров, связанных с импортом сахаров, которые являются, в первую очередь, источниками энергии. В процессе теплового стресса клетка нуждается в АТФ, т.к. он необходим как для синтеза, так и для работы шаперонов. Один цикл шаперона DnaK сопряжён с гидролизом 1 молекулы АТФ, а GroESL – семи. Также происходит увеличение транскрипции транспортёров с неизвестной функцией, в том числе эффлюксных (MdlB-типа). Транспортёры *Nat* характерны только для микоплазм и их субстратная специфичность не ясна. Предполагается, что они могут быть переносчиками фосфата или фосфоната. ABC-транспортёры, как правило, представляют собой мультисубъединичные белки. Закономерно, наблюдается увеличение транскрипции всех субъединиц данного транспортёра, которые, как правило, составляют один оперон. Два ионных канала, задействованных в ответе на тепловой стресс также образуют один оперон.

Механочувствительный канал высокой проводимости участвует в защите клетки от гипоосмотического стресса. Он открывается при некотором пороговом натяжении мембраны и позволяет проходить ионам и воде для выравнивания осмотического давления. Его функция при тепловом стрессе неясна. Надо также отметить, что функциональная аннотация транспортёров на основе гомологии на сегодняшний день недостаточно разработана и в действительности описанные транспортёры могут обладать немного иной субстратной специфичностью.

Также при тепловом стрессе у *M. gallisepticum* происходит увеличение транскрипции ряда генов метаболических ферментов. Среди них рибофлавинкиназа, маннозо-6-фосфат изомеразы, мальтозо-фосфорилазы, цитрил-КоА лигаза, цитрат-лиаза, аргинин-деиминаза, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, β -фосфоглюкомутаза, два гена альдегид-дегидрогеназы с неизвестной функцией, белок-переносчик жирных кислот (ACP), дезоксиуридин-5'-трифосфат нуклеотидогидролаза, тимидилат-киназа, деоксицитидилат-деаминаза и дигидрофолат-редуктаза, НАД⁺-киназа и 2-С-метил-D-эритритол 4-фосфат цитидилтрансфераза. Ряд этих ферментов, а также транспортёров, рассмотренных выше, образуют метаболические пути. Можно сделать вывод, что тепловой стресс вызывает увеличение утилизации всех возможных источников энергии. Так, увеличивается транскрипция транспортёров сахаров, в том числе глюкозы, а также маннитола. При этом увеличивается транскрипция генов ферментов утилизации маннозы (маннозо-6-фосфат изомеразы) и мальтозы (мальтозо-фосфорилазы и β -фосфоглюкомутаза). При этом манноза поступает в клетку через PTS систему в виде маннозо-6-фосфата и, таким образом, маннозо-6-фосфат изомеразы осуществляет единственную реакцию для включения маннозы в гликолиз. Путь утилизации мальтозы состоит из мальтозо-фосфорилазы и β -фосфоглюкомутаза. Таким образом, происходит увеличение транскрипции генов ферментов всего пути. Также при тепловом стрессе происходит увеличение транскрипции генов дезоксиуридин-5'-трифосфат нуклеотидогидролазы и тимидилат-киназы. Это, по-видимому, свидетельствует о том, что клетка ускоряет удаление дУТФ и синтез дТДФ. Также наблюдается увеличение транскрипции

гена деоксицитидилат-дезаминазы. Это бифункциональный фермент, который осуществляет взаимопревращение дУМФ в дЦМФ а также является дигидрофолат-редуктазой. Наблюдаемое изменение транскрипции генов ферментов метаболизма пиримидинов является логичным, поскольку дУТФ, являясь аналогом дТТФ, может встраиваться в ДНК и приводить к мутагенезу. Для предотвращения этого дУТФ переводится в дУМФ, а затем в цЦМФ (Рисунок 26), а концентрация дТТФ наоборот, увеличивается. Отдельным вопросом является то, почему при тепловом стрессе возникает необходимость дополнительного удаления дУТФ. Возможно, это связано с общей интенсификацией энергетического метаболизма, вследствие чего происходит усиленный синтез трифосфатов. При этом, у *M. gallisepticum* редуцирована система специфического синтеза каждого из трифосфатов. В результате *M. gallisepticum*, по-видимому, использует ферменты широкой субстратной специфичности, например, пируват-киназу, что и приводит к накоплению нежелательных соединений.

В результате теплового стресса происходит увеличение транскрипции гена аргинин-деиминазы. Аргинин-деиминаза может участвовать в защите от кислого стресса в силу того, что одним из продуктов реакции является аммиак. Можно предположить, что закисление цитоплазмы в тепловом стрессе является результатом интенсификации энергетического метаболизма. Единственным путём энергетического метаболизма *M. gallisepticum* является гликолиз, продуктом которого неизбежно является кислота – пируват или лактат. Таким образом, ускорение гликолиза при неизменной скорости удаления метаболитов из цитоплазмы может приводить к её закислению.

Увеличение транскрипции белка-переносчика жирных кислот может свидетельствовать о том, что в процессе теплового стресса происходит изменение липидного состава клеточной мембраны.

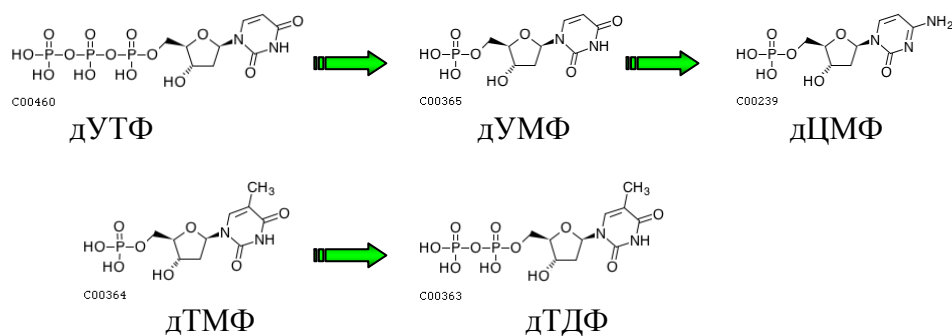


Рисунок 26. Пути метаболизма нуклеотидов, гены ферментов которых увеличивают транскрипцию при тепловом стрессе.

Также наблюдается рост фермента метаболического пути синтеза терпеноидов – 2-С-метил-D-эритритол 4-фосфат цитидилтрансферазы. Биологический смысл синтеза терпеноидов в микоплазмах не ясен. Возможно, они играют роль протекторов при окислительном стрессе.

Интересно, что при тепловом стрессе происходит переключение транскрипции изоформ глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы. Транскрипция одной из форм увеличивается в 3 раза, а другой – падает на аналогичную величину.

Гены белков репарации ДНК также задействованы в ответе на тепловой стресс. В эту группу входят гены *recR*, *recU*, *rarA*, *uvrA*, *ruvA*, *ruvB*, *gyrA* и *gyrB*. Гены субъединиц ДНК-гиразы *gyrA* и *gyrB*, а также *ruvA* и *ruvB* организованы в опероны. Белки RecU, RuvA и RuvB обеспечивают перемещение и разрешение структуры Холидея. Возможно, в тепловом стрессе происходит повреждение ДНК и репарация с помощью гомологичной рекомбинации.

В геноме *M. gallisepticum* есть два гена белков метаболизма железа: ферритина и Dps. Уровень транскрипции обоих увеличивается при тепловом стрессе. Ферритин участвует в запасании железа, а Dps выполняет несколько функций, включая запасание железа, удаление активных форм кислорода и защиту ДНК. Транскрипция ферритиновых белков может находиться под контролем транскрипционных факторов окислительного стресса. Увеличение транскрипции генов ферритиновых белков у *M. gallisepticum* может быть результатом либо окислительного стресса, возникающего в результате теплового,

либо следствием подготовки к ожидаемому окислительному стрессу. Последнее имеет смысл в силу того, что в естественных условиях обитания *M. gallisepticum* увеличение температуры сигнализирует о начале воспаления, компонентом которого является продукция активных форм кислорода. В тепловом стрессе увеличивается транскрипция гена флаводоксина GCW_02248. Флаводоксины также участвуют в защите от окислительного стресса.

Гены ряда белков, связанных с процессом трансляции также увеличивают транскрипцию в тепловом стрессе. К ним относятся факторы трансляции EF-G и EF-Ts, 16S рРНК m(4)C1402 метилтрансфераза, метилтрансфераза рРНК SpoU, 16S рРНК-метилтрансфераза G, ГТФаза модификации тРНК TrmE, ГТФаза биогенеза рибосом, тРНК-специфичная 2-тиоуридилаза MnmA, рибосомальные белки S2, S15, L1, L11, L31, пептидил-тРНК гидролаза.

Среди генов, увеличивающих транскрипцию при тепловом стрессе, есть также гены белков клеточного деления. Они организованы в один оперон и включают *mraZ*, *mraW*, *ftsZ* и ген с неизвестной функцией GCW_02954. Возможно, что таким образом *M. gallisepticum* адаптирует клеточный цикл в стрессовых условиях.

Среди генов уменьшающих уровень транскрипции в тепловом стрессе следует выделить гены гемагглютининов *vlhA*. Уменьшение транскрипции характерно для подавляющего большинства *vlhA* из присутствующих в геноме (биологическая роль подробно рассмотрена далее в протеомной секции). При этом также существуют некоторые гены *vlhA*, транскрипция которых напротив, растёт при тепловом стрессе.

В тепловом стрессе происходит возрастание транскрипции генов с неизвестной функцией GCW_00635 и GCW_00630. Они считываются в составе единого транскрипта. У *M. gallisepticum* R в гомологичном месте генома располагаются три гена MGA_0578a, MGA_0578b и MGA_0578c. В дальнейшем соответствующий локус и транскрипт будут называться 0578 (из соображений гомологии). Интересно, что никаких белков, потенциально закодированных в локусе 0578, нами обнаружено не было. По-видимому, продукт гена 0578

представляет собой некодирующую РНК, возможно, обладающую регуляторными функциями. Вследствие этого была выдвинута гипотеза, что РНК 0578 может быть задействована в межклеточной коммуникации и, возможно, кодирует короткие экспортируемые пептиды. Первая часть этой гипотезы гипотеза была экспериментально проверена (Рисунок 27). Для этого была взята культуральная среда от клеток, которые росли при 37 и от клеток, которые подверглись тепловому стрессу, а также свежая среда и прогретая при 46 свежая среда. К соответствующим средам добавлялись клетки *M. gallisepticum* в логарифмической фазе в количестве 10%. Клетки инкубировались 30 мин, и затем измерялась транскрипция ряда выбранных генов, в том числе локуса 0578. Также прогретая среда пропусклась через фильтр, отсекающий соединения с молекулярной массой >5 кДа. Такая среда также индуцировала РНК 0578, хотя величина ответа была несколько снижена. Был также поставлен аналогичный эксперимент с исходной средой, прогретой и непрогретой. В результате было обнаружено, что РНК 0578 индуцируется при инкубации клеток в среде, полученной от прогретых клеток. В среде от непрогретых клеток индукция не происходит. При инкубации в исходной среде также имеет место индукция 0578, но она гораздо слабее, чем при инкубации со средой от прогретых клеток. Пропускание культуральной среды от прогретых клеток через молекулярный фильтр на 5 кДа приводило к тому, что индукция РНК 0578 в элюате несколько снижалась. Таким образом, можно сделать вывод, что РНК 0578 задействована в межклеточной коммуникации при ответе на тепловой стресс. Химическая природа действующего агента остаётся невыясненной. Это, по-видимому, не белок, т.к. его масса не превосходит 5 кДа.

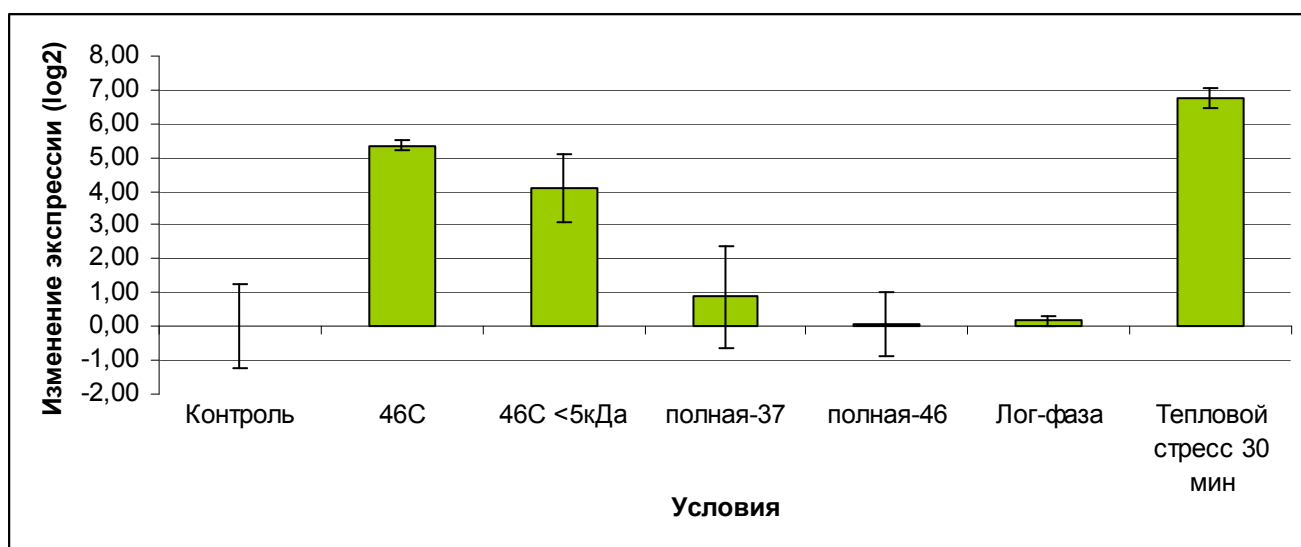


Рисунок 27. Индукция РНК 0578 в разных условиях. Контроль – экспрессия в среде от клеток выращенных при 37С в логарифмической фазе, 46С – среда от клеток, прогретых при 46С, 46С < 5кДа – среда от клеток, прогретых при 46С и пропущенная через 5 кДа фильтр, полная-37 – исходная среда выдержанная при 37С, полная-46 – исходная среда, выдержанная при 46С, во всех случаях пересаживалось 10% клеток с инкубацией 30 мин; лог-фаза – экспрессия РНК 0578 в клетках в логарифмической фазы, тепловой стресс 30 мин – экспрессия РНК 0578 в тепловом стрессе 46С 30 мин в логарифмической фазе.

Для теплового стресса мы провели дополнительное картирование сайтов инициации транскрипции. В результате было обнаружено, что при тепловом стрессе начинают проявлять активность дополнительные «спящие» промоторы. Спящим промотором мы считали такой, который не детектировался ни в одном эксперименте в контроле и детектировался в обоих экспериментах в тепловом стрессе. Всего было обнаружено 85 таких промоторов. Из них только 9 стоят около генов (не более 200 п.о.). Можно сделать вывод, что при тепловом стрессе происходит общая активация транскрипции и, вероятно, это процесс носит, в основном, неспецифический или глобальный характер. Это также согласуется с вышеописанными данными по транскрипции генов. Генетической детерминантой увеличения транскрипции при этом может быть не сайт связывания транскрипционного фактора, а сама структура промотора. Для проверки этой гипотезы было проведено исследование влияния известных структурных элементов промотора *M. gallisepticum* на изменение транскрипции соответствующих генов (Рисунок 28). Было обнаружено, что у промоторов с низким базовым уровнем транскрипции, которая при этом увеличивается при

стрессе, в среднем, окружение является неоптимальным и реже встречается спейсер оптимальной длины. Среди промоторов с высокой базовой транскрипцией чаще встречается EХТ-элемент, причём доля таких промоторов выше среди тех, транскрипция которых при этом растёт при стрессе. Также у них преимущественно встречается оптимальный -10-бокс. Среди промоторов, транскрипция которых растёт (с низкой и высокой базовой транскрипцией), чаще встречается -10-бокс ТААААТ, а не ТАТААТ, и наоборот, среди тех, транскрипция которых падает, чаще встречается ТАТААТ.

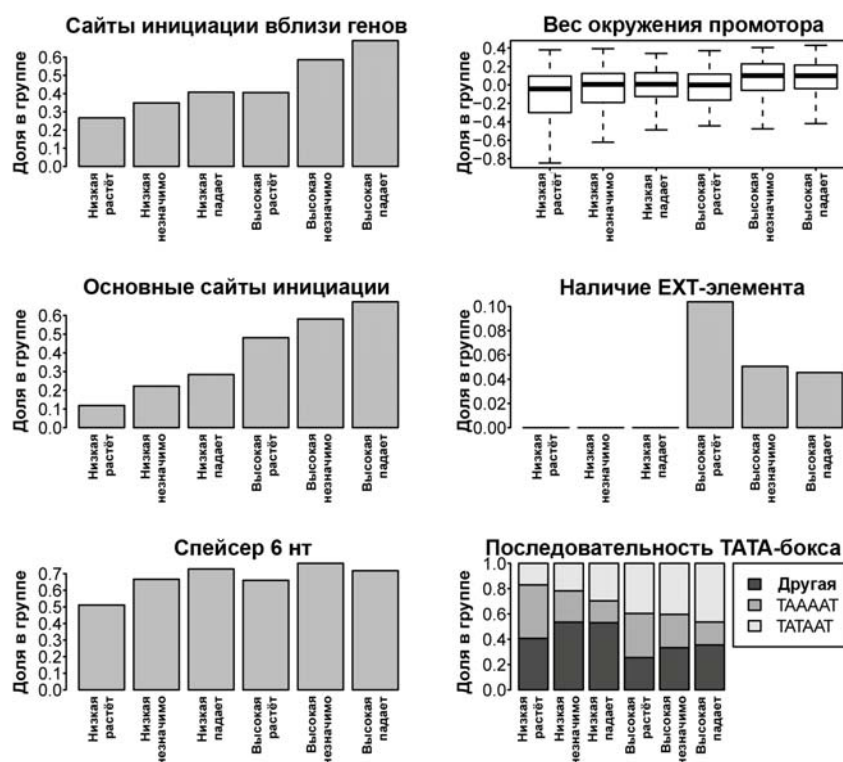


Рисунок 28. Влияние генетических детерминант в промоторе на его транскрипцию в тепловом стрессе. По горизонтальным осям – характер транскрипции в норме (низкая или высокая) и динамика при тепловом стрессе (падает, растёт или меняется незначимо). Промоторы с низким базовым уровнем транскрипции, которая при этом увеличивается при стрессе как правило стоят не около генов и не являются первичными. У таких промоторов в среднем хуже окружение и реже встречается спейсер оптимальной длины. Среди промоторов с высокой базовой транскрипцией чаще встречается EХТ-элемент, причём доля таких промоторов выше среди тех, транскрипция которых при этом растёт при стрессе. Также у них преимущественно встречается оптимальный -10-бокс. Среди промоторов, транскрипция которых растёт (с низкой и высокой базовой транскрипцией), чаще встречается -10-бокс ТААААТ, а не ТАТААТ, и наоборот, среди тех, транскрипция которых падает, чаще встречается ТАТААТ.

Окислительный стресс задействует существенно меньше генов, нежели тепловой стресс (48, 31 растёт, Приложение, Таблица 4), что, по-видимому, предполагает более специфичную регуляцию. Из тех генов, транскрипция которых растёт в окислительном стрессе, 10 непосредственно связано с защитой от него, а функция 7 неизвестна. В группу генов защиты от окислительного стресса входят гены, связанные с метаболизмом FeS-кластеров (организованы в один оперон): 2 гомолога *sufB*, *sufC*, *nifU*, *csdA* (цистеин-десульфуреза) и шаперон *dnaJ_4*. По-видимому, *M. gallisepticum* аналогично *E. coli* имеет специализированный шаперон *dnaJ_4*, ассоциированный с комплексом сборки FeS кластеров. В отличие от *E. coli* у *M. gallisepticum* нет соответствующего гомолога DnaK. Также увеличивают транскрипцию гены метионин-сульфоксид редуктазы *msrB* (транскрипция *msrA* растёт, но ниже порогового значения), флаводоксина, азоредуктазы *azoR* и пероксиредоксина *osmC*.

Помимо этого при окислительном стрессе растёт транскрипция двух генов транспорта фосфолипидов GCW_03143 и GCW_03148, составляющих один оперон. Кроме этого увеличивается транскрипция генов аминокислотного транспортёра и экспортёра бактериоцинов. Также наблюдается рост транскрипции генов двух гомологов НАД-зависимой альдегид-дегидрогеназы и маннитол-специфичной субъединицы ПВ PTS-транспортёра, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, β -фосфоглюкомутазы и цитрат-лиазы, транскрипция которых увеличивается также при тепловом стрессе.

Солевой стресс *M. gallisepticum* интересен в связи с тем, что она способна выдерживать 1,2 М раствора NaCl (в два раза больше, чем в морской воде) в течение часа. Солевой стресс вызывает изменение транскрипции 91 гена (50 увеличивают транскрипцию, Приложение, Таблица 5). Из них увеличивают транскрипцию 19 генов с неизвестной функцией. В целом, среди наблюдаемых изменений нет таких, приспособительная ценность которых была бы однозначно ясна. В солевом стрессе наблюдается увеличение транскрипции генов шаперонов *clpB*, *lon* и *dnaJ_3abc*. Также происходит увеличение транскрипции генов

метаболических ферментов: двух гомологов глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, цитрил-КоА лигазы, двух гомологов НАД-зависимой альдегид дегидрогеназы, и маннозо-6-фосфат изомеразы. Эти гены также вовлечены в ответ на другие формы стресса, что позволяет предположить либо что *M. gallisepticum* приспосабливается к стрессу преимущественно с помощью перестройки метаболизма, либо что соответствующие белки имеют альтернативные функции. Интересно, что при солевом стрессе происходит увеличение транскрипции генов некоторых гемагглютининов *vlhA*.

В стационарной фазе транскрипционный профиль *M. gallisepticum* претерпевает драматические изменения (Приложение, Таблица 6) [78]. Прежде всего, они связаны с тотальным падением транскрипции большей части генов (636 гена, 88% белок-кодирующих генов). При этом 25 генов увеличивают транскрипцию. Среди генов, увеличивающих транскрипцию в стационарной фазе, преимущественно гены стрессового ответа, причём среди них есть гены ответа как на тепловой, так и окислительный стресс. Сюда относятся гены шаперонов *clpB* и *dnaK*, два гена пероксиредоксинов *osmC*, два гена метионин-сульфоксид редуктаз *msrA* и *msrB*, азоредуктаза, флаводоксина и ферритинового белка *dps*. Также наблюдается увеличение транскрипции генов, для которых показано участие в стрессовом ответе в настоящей работе. К ним относятся гены фосфолипид-связывающих белков, липазы и субтилизиновой протеазы. На основе этих данных можно заключить, что стационарная фаза вызывает сильный стресс, причём, по-видимому, в стационарной фазе имеет место также окислительный стресс. Также происходит увеличение транскрипции генов гистонотипного белка HU. Белок HU, возможно также обладает протекторной функцией в данной ситуации.

Интересно, что в стационарной фазе также растёт транскрипция генов пируват-дегидрогеназы, лактат-дегидрогеназы и фосфотрансацетилазы. Это может быть результатом того, что клетка пытается использовать лактат, образовавшийся в ходе гликолиза в логарифмической фазе, в качестве источника энергии, либо повышает таким образом выход АТФ из гликолиза (Рисунок 29). У

M. gallisepticum есть метаболический путь утилизации пирувата до ацетата, наряду с более простым путём образования лактата. В этот путь входят пируват-дегидрогеназа, фосфотрансацетилаза и ацетат-киназа. Конечным продуктом реакции является ацетат. Проблема заключается в том, что пируват-дегидрогеназа продуцирует НАДН и, соответственно, зависит от притока НАД, аналогично тому, как это происходит при молочнокислом брожении. В последнем случае НАД регенерируется за счёт восстановления пирувата до лактата. Если при молочнокислом брожении расход и поступление НАД сбалансированы, то если включается путь до ацетата происходит образование дополнительного количества восстановительных эквивалентов, для которых нет акцепторов. Для *M. gallisepticum* единственный вариант регенерации НАД помимо сброса электронов на пируват с образованием лактата является сброс электронов на кислород с помощью НАДН-оксидазы. При этом неизбежно происходит образование активных форм кислорода, что приводит к окислительному стрессу.

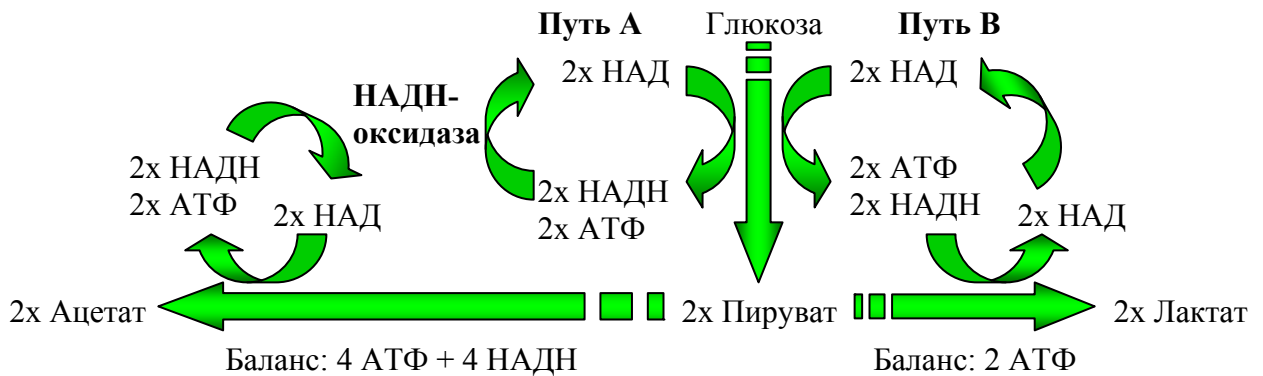


Рисунок 29. Схема энергетического метаболизма *M. gallisepticum*. Молочнокислое брожение (Путь В) даёт 2 моль АТФ на моль глюкозы, НАД регенерируется с помощью восстановления лактата. При использовании альтернативного пути (А) выход составляет 4 моль АТФ на моль глюкозы, при этом образуется 4 моль НАДН. Единственный механизм регенерации НАД в этом случае – НАДН-оксидаза.

Переход *M. gallisepticum* в стационарную фазу кардинально меняет способность клетки реагировать на стресс. Тепловой стресс в стационарной фазе не приводит к каким-либо значимым изменениям на уровне транскрипции. С одной стороны, часть генов задействованных в стрессовом ответе и, в частности, ответе на тепловой стресс, уже увеличили транскрипцию на максимальную

величину (относительно соответствующего стресса). Это, по-видимому, приводит к тому, что клетка заранее готова к стрессу. С другой стороны, ряд генов, транскрипция которых увеличивается при тепловом стрессе и которые имеют очевидную приспособительную ценность и описанный механизм регуляции в тепловом стрессе напротив не увеличивают транскрипцию. К таким генам относятся *lon* и *dnaJ_3*. Оба они имеют CIRCE в промоторе и увеличивают транскрипцию в тепловом стрессе. При этом в стационарной фазе их транскрипция падает, а в тепловом стрессе в стационарной фазе индукция не происходит. По-видимому, в стационарной фазе существует некий специальный механизм регуляции транскрипции, который сводит на нет работу системы CIRCE-HrcA.

При трёх типах стресса в логарифмической фазе растёт транскрипция только 7 общих генов (Рисунок 30). К ним относятся два гомолога НАД-зависимой альдегид-дегидрогеназы, один ген *vlhA* и 4 гена с неизвестной функцией. Для них характерен паттерн постепенного роста транскрипции в тепловом стрессе с максимумом в 30 минутах. Интересно, что функции генов, задействованных в универсальном ответе на стресс у *M. gallisepticum*, по существу неизвестны. Следует отметить также, что подавляющее большинство генов, снижающих транскрипцию в тепловом стрессе, снижают её также в стационарной фазе. По-видимому, в данном случае работает некий общий механизм репрессии транскрипции.

В ответе на все виды стресса принимают участие гены с неизвестной функцией. Доля их, однако, различается (Рисунок 31). Этот показатель можно использовать для оценки понимания ответа на тот или иной стресс. С другой стороны, это может быть показателем специфичности изменений. Поскольку гены с неизвестной функцией вряд ли принадлежат к одной функциональной группе, доля задействованных генов, близкая к средней, скорее всего, означает неспецифический ответ. Наименьшая доля генов с неизвестной функцией среди увеличивающих транскрипцию в стационарной фазе. Наибольшая – среди генов увеличивающих транскрипцию в солевом и тепловом стрессе. Можно сделать

вывод, что в стационарной фазе ответ в виде увеличения транскрипции носит наиболее специфический характер и хорошо описан, что согласуется с анализом на основе аннотации этих генов. При этом падение транскрипции носит, по-видимому, неспецифический характер.

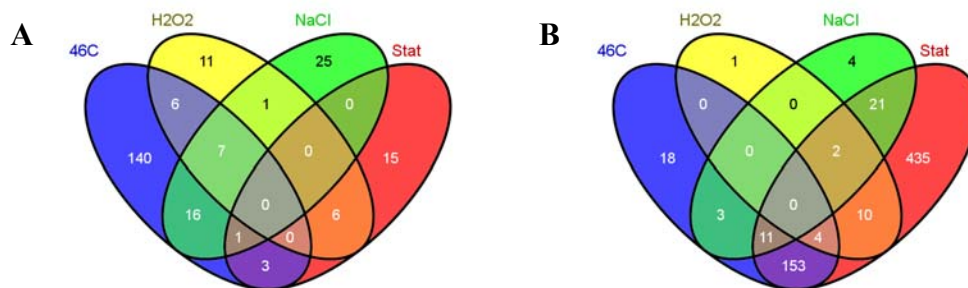


Рисунок 30. Количество генов, увеличивающих (А) и уменьшающих (В) транскрипцию в разных типах стресса. Синий – тепловой стресс, жёлтый – окислительный стресс, зелёный – солевой стресс, красный – стационарная фаза.

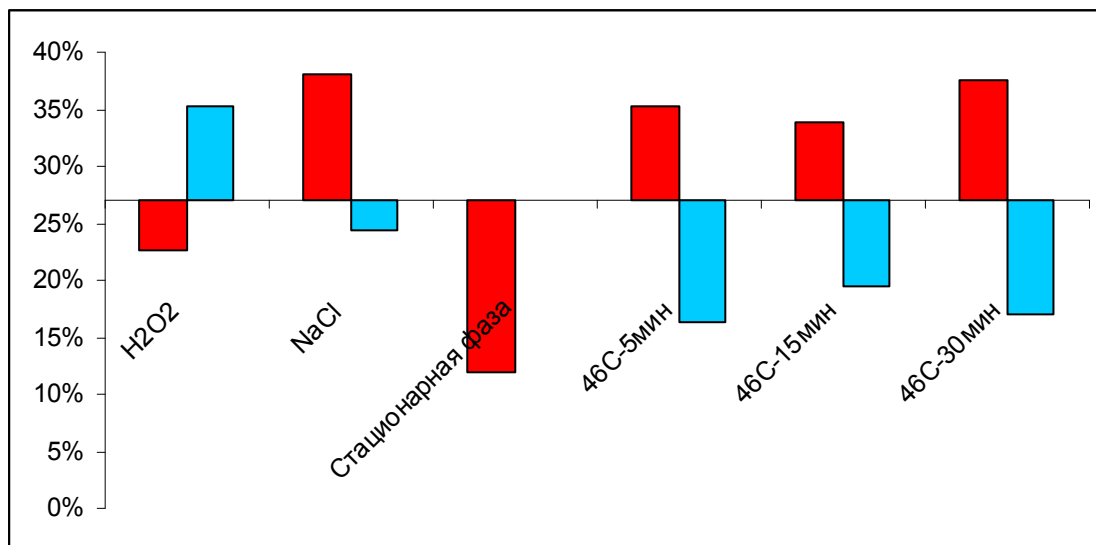


Рисунок 31. Доля генов с неизвестной функцией, участвующих в ответе на разные типы стресса. Красным показаны гены, увеличивающие транскрипцию, синим – уменьшающие транскрипцию. Средняя доля генов с неизвестной функцией в геноме – 27%, через эту величину проведена ось X. Наименьшая доля генов с неизвестной функцией среди увеличивающих транскрипцию в стационарной фазе. Наибольшая – среди генов увеличивающих транскрипцию в солевом и тепловом стрессе.

Ингибиторный анализ транскрипционного ответа M. gallisepticum

На основе транскриптомных данных было сделано предположение, что общая репрессия транскрипции в стационарной фазе может быть результатом снижения суперскрученности геномной ДНК. Влияние топологии геномной ДНК на транскрипцию было показано в ряде работ, причём было показано, что релаксация ДНК, как правило, ведёт к снижению транскрипции. При этом существуют промоторы как, нечувствительные к суперскрученности ДНК, так и чувствительные. Для проверки этой гипотезы был использован ингибитор ДНК-гиразы новобиоцин. Новобиоцин ингибирует ДНК-связывающую субъединицу, но не влияет на субъединицу, отвечающую за расщепление и сшивку ДНК. В результате обработка новобиоцином приводит к релаксации геномной ДНК без её повреждения.

Для исследования влияния новобиоцина была измерена транскрипция 98 генов. В эту группу вошли гены, которые как снижают уровень транскрипции в стационарной фазе, так и те которые его не меняют или повышают. В результате общая картина изменений на уровне транскрипции при обработке новобиоцином и в стационарной фазе оказывается практически одинаковой. Отличием является то, что гены, транскрипция которых растёт в стационарной фазе, например *clpB*, снижают транскрипцию при обработке новобиоцином. Однако генов, транскрипция которых растёт в стационарной фазе вообще немного, что позволяет предположить наличие специального активатора, который синтезируется при переходе на стационарную фазу и, закономерно, не успевает синтезироваться при обработке новобиоцином. В результате можно сделать вывод, что глобальное подавление транскрипции в стационарной фазе обусловлено релаксацией геномной ДНК.

На основе данных по транскриптомике и протеомике было сделано предположение, что в ответе *M. gallisepticum* на тепловой стресс участвует клеточная мембрана. Для проверки этой гипотезы был проведён ингибиторный анализ с применением ингибитора АВС-транспортёров – резерпина и протонного ионофора CCCP (карбонил-цианид хлорфенилгидразон). Концентрации

ингибиторов были подобраны как суб-летальные. При этом концентрация СССР была достаточной для полного снятия протонного градиента. Влияние этих соединений существенно отличается. Резерпин почти не вызывает ответа на транскрипционном уровне. Обработка СССР вызывает сильный стрессовый ответ (наиболее сильный по амплитуде из всех, которые наблюдались).

При обработке СССР наблюдалось увеличение транскрипции 13 из 98 исследованных генов. Они, включают гены шаперонов *clpB*, *lon*, *dnaJ_2*, *dnaK*, ген пероксиредоксинов *osmC* и GCW_03653, гены фосфолипид-связывающих белков GCW_03143 и GCW_03148, ABC-транспортёра *hatA*, гипотетического альтернативного сигма-фактора, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, маннозо-6-фосфат изомеразы и β -фосфоглюкомутазы. В этот список попадают все CIRCE-зависимые гены *M. gallisepticum*, а также ряд генов, участвующих в ответе на окислительный стресс: пероксиредоксины и фосфолипид-связывающие белки. В целом, ответ на обработку СССР включает гены, участвующие в ответе как на тепловой стресс – группа CIRCE-зависимых генов и окислительный стресс, что позволяет предположить некий общий механизм индукции транскрипции соответствующих генов.

Механизмы влияние СССР на транскрипцию могут быть разными. В том числе опосредовано через истощение пула нуклеозид-трифосфатов. Единственным средством поддержания протонного градиента на мембране у *M. gallisepticum* является АТФаза F₀F₁-типа. Существует работа, где для близкородственного вида *M. pneumoniae* было теоретически предсказано, что большая часть АТФ в клетки тратится на поддержание протонного градиента на мембране [80]. Добавление протонного ионофора может привести к тому, что АТФаза не может вывести протонный градиент на насыщение и вынуждена постоянно тратить АТФ, что неизбежно приведёт к истощению клеточного пула АТФ и, как следствие, других трифосфатов. Истощение нуклеозид-трифосфатов или изменение их соотношения, в свою очередь, может непосредственно влиять на транскрипцию. Аналогичный процесс истощения пула АТФ может идти и при тепловом стрессе, когда АТФ расходуется шаперонами для поддержания

фолдинга белков. Для проверки этой гипотезы был измерен уровень АТФ в клетках *M. gallisepticum* в норме, в тепловом стрессе и при обработке CCCP. Было показано, что уровень АТФ при обработке CCCP не только не падает, но и незначительно растёт (Рисунок 32). Таким образом, влияние мембранного протонного градиента на транскрипцию происходит не через пул АТФ.

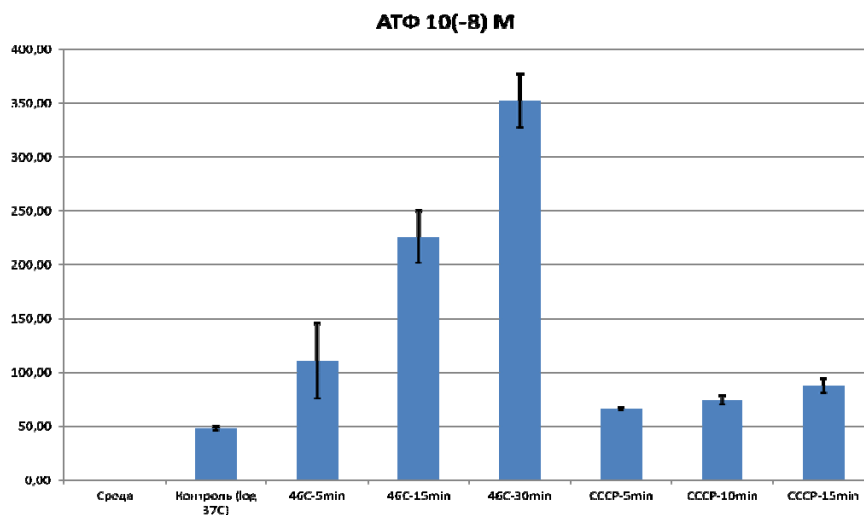


Рисунок 32. Измерение концентрации АТФ в клетках *M. gallisepticum* при тепловом стрессе и обработке CCCP.

3.3. Протеомный анализ *M. gallisepticum*

Анализ функционального протеомного ядра молликут в стрессовых воздействиях

В настоящей работе нами (совместно с Д.Г. Алексеевым) был проведён сравнительный протеомный анализ трёх видов молликут: *Acholeplasma laidlawii*, *M. gallisepticum* и *M. mobile*. Идентификация белков *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* проводилась в рамках настоящей работы [13], [81], а данные по *M. mobile* были взяты из публикации Яффе и др. [82]. В результате было идентифицировано 209 кластеров ортологичных групп (COG) белков, присутствующих в протеомах трёх видов микоплазм. Кластеры ортологичных групп представляют собой

совокупности белков (и кодирующих их генов), являющихся гомологами и обнаруживаемых не менее чем в трёх филетических линиях (в данном случае прокариот). Логика данной классификации построена таким образом, чтобы белки, получающие одинаковый идентификатор COG являлись функциональными аналогами. Это условие, конечно, выполняется с некоторой долей приближения.

С учётом технических ограничений в области идентификации гидрофобных белков, а также белков с небольшой молекулярной массой, в результате работы был сделан вывод, что такое количество белков представляет собой функциональное ядро клетки бактерий класса молликут. В данное ядро входит минимальный набор белков транскрипции, трансляции, репликации, ферменты гликолиза, некоторые шапероны и ряд других белков [13]. Функциональное ядро играет роль каркаса и организатора базовых клеточных процессов, а потому является константной частью клетки.

На основе этих данных, нами было сделано теоретическое предсказание, что адаптивные функции микоплазм преимущественно вынесены за предел этого функционального ядра. Другими словами ответ на стресс является в большой степени видоспецифичным и гены и белки стрессового ответа преимущественно не входят в функциональное ядро клетки. Для проверки этой гипотезы были использованы данные по транскрипционному профилированию *M. gallisepticum*, полученные в настоящей работе. Гены, изменяющие уровень транскрипции при стрессе, были сгруппированы по кластерам ортологичных групп (подавляющее большинство кластеров включали по одному гену *M. gallisepticum*) и по направлению изменения уровня транскрипции (увеличение или уменьшение). Для каждого типа стресса определялась доля кластеров, входящих в функциональное ядро молликут. Всего доля кластеров ортологичных групп, входящих в функциональное ядро среди всех кластеров *M. gallisepticum* составляет 52% (212 из 409) [13]. В результате нашего исследования было установлено, что доля генов кластеров функционального ядра, задействованных в ответ на стресс составляет небольшую часть от совокупности генов функционального ядра (Рисунок 33). Доля задействованных генов функционального ядра растёт вместе с общим

количеством задействованных генов и максимальна в тепловом стрессе 15 и 30 минут. Доля генов функционального ядра, уменьшающих транскрипцию для теплового стресса в 2-3 раза больше аналогичной доли среди генов, увеличивающих транскрипцию. Для других типов стресса эти показатели одинаковы.

Доля генов функционального ядра среди всех генов, увеличивающих транскрипцию в ответ на стресс составляет от 10 до 20%. При этом средняя доля генов функционального ядра среди всех генов (сгруппированных по COG) составляет 52%. В стационарной фазе ситуацию противоположна – доля генов функционального ядра увеличивающих уровень транскрипции близка к средней. Таким образом, при стрессе преимущественно происходит увеличение транскрипции генов, не входящих в функциональное ядро. При выходе на стационарную фазу в равной степени задействуются гены входящие и не входящие в функциональное ядро. Для генов уменьшающих уровень транскрипции этот эффект выражен гораздо слабее.

Полученные нами данные, включая приведённые на Рисунке 28 в подразделе (Транскрипционный ответ *M. gallisepticum* на стрессовые воздействия), позволяют предположить, что при тепловом стрессе происходит вытеснение РНК-полимеразы с промоторов ряда генов «домашнего хозяйства», в том числе входящих в функциональное ядро за счёт активации других промоторов. Также тепловой стресс отличается от остальных гораздо большим количеством генов, увеличивающих транскрипцию, что согласуется с гипотезой о вытеснении РНК-полимеразы с промоторов генов, снижающих транскрипцию. Пул РНК-полимераз в клетки ограничен, и синтез нового фермента не происходит. При множественной и значительной активации промоторов пул свободных ферментов РНК-полимеразы может истощаться, что приведёт к конкуренции за фермент между промоторами. Такой эффект описан в литературе под названием «queueing» (дословно «организация очереди») [83]. По скорости регуляции экспрессии генов такой способ может конкурировать с транскрипционными факторами.

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что адаптация к стрессу обуславливает экспрессию генов, преимущественно не входящих в функциональное ядро, что согласуется с высказанной нами ранее гипотезой. При этом снижение уровня транскрипции множества генов в тепловом стрессе, по-видимому, связано с конкуренцией между промоторами за РНК-полимеразу, а не влиянием специфических регуляторов.

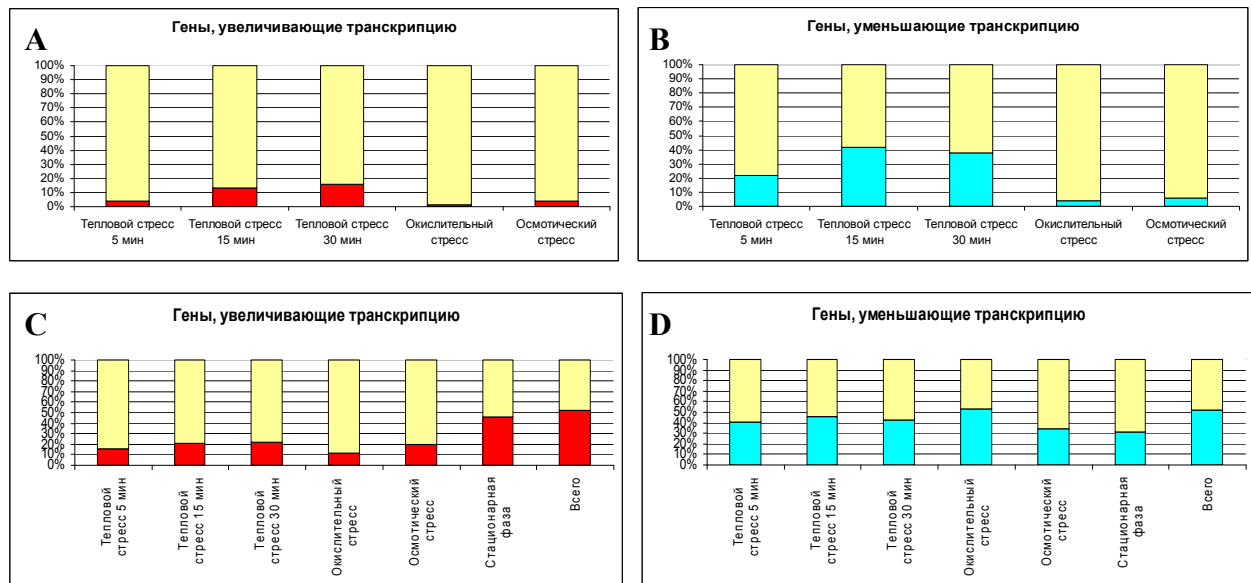


Рисунок 33. Доля генов кластеров ортологичных групп (COG), входящих в функциональное ядро молликут и задействованных в ответе на стресс. А – доля генов COG функционального ядра, увеличивающих транскрипцию в стрессе. В – доля генов COG функционального ядра, уменьшающих транскрипцию в стрессе. С – доля генов COG функционального ядра среди генов, увеличивающих транскрипцию в ответ на тепловой стресс. D – доля генов COG функционального ядра среди генов, уменьшающих транскрипцию в ответ на тепловой стресс.

Белковый ответ *M. gallisepticum* на стрессовые воздействия

Протеомный анализ ответа *M. gallisepticum* на стресс проводился на модели теплового стресса. При этом для количественного анализа были использованы технологии дифференциального двумерного электрофореза и безметочной количественной масс-спектрометрии MRM (совместно с С. И. Ковальчуком). Особенностью микоплазм, как было установлено в данной работе и показано группой Serrano и др. [21] является относительно небольшая амплитуда изменения представленности белков. Также нами было установлено, что

достоверно определяемое изменение представленности белков *M. gallisepticum* происходит за достаточно долгий период времени – от 15 до 30 минут. Всего в тепловом стрессе в логарифмической фазе было обнаружено изменение представленности 23 белков, а в стационарной фазе – 6 белков (Приложение, Рисунок 1, Таблицы 10, 11 и 12).

В тепловом стрессе в логарифмической фазе происходит увеличение представленности шаперонов ClpB, DnaK, и GroEL, FeS-шаперона SufC, пероксиредоксина OsmC, тиоредоксина, транспортёров HatA и PotD, факторов элонгации трансляции EF-Tu и EF-Ts, НАДН-оксидазы, фактора созревания рибосом, δ -субъединицы РНК-полимеразы, трёх поверхностных антигенов семейства Vlh и двух белков с неизвестной функцией. При этом происходит снижение представленности фосфолипид-связывающего белка, α - и β -субъединиц пируват дегидрогеназы, триозо-фосфат изомеразы и одного белка с неизвестной функцией. Корреляция между изменением транскрипции и изменением трансляции наблюдается для небольшого количества генов, для которых характерно, во-первых, сильное увеличение уровня транскрипции, порядка 10 раз и, во-вторых, наличие сильного сайта связывания рибосомы. К таким генам относятся *clpB* и *hatA*. Индукция РНК гена *dnaK* незначительна, но, по-видимому, это компенсируется сильным сайтом связывания рибосомы.

Ответ на тепловой стресс на уровне белка в стационарной фазе затрагивает существенно меньше белков, чем в логарифмической. Это соответствует с данными по транскрипционному профилированию, где было показано, что ответ на уровне транскрипции на тепловой стресс в стационарной фазе отсутствует. В тепловом стрессе в стационарной фазе происходит увеличение представленности транспортёра PotD, НАДН-оксидазы и δ -субъединицы РНК-полимеразы. При этом происходит падение представленности α -субъединицы пируват дегидрогеназы, фактора трансляции EF-Tu и белка с неизвестной функцией. По-видимому перечисленные белки имеют специализированные механизмы регуляции экспрессии на уровне трансляции.

Индукция НАДН оксидазы при стрессе может быть связана с потребностью клетки в АТФ как для обеспечения синтеза необходимых защитных белков, так и для обеспечения их работы. Анализ организации метаболических сетей *M. gallisepticum* показывает, что регенерация НАД с помощью НАДН-оксидазы может быть лимитирующей стадией в процессе синтеза АТФ по более энергетически выгодному пути с использованием пируват-дегидрогеназы (рис. 29).

Характер протеомного ответа на тепловой стресс позволяет предположить, что тепловой стресс может быть связан с окислительным. На это указывает индукция защитных белков: пероксиредоксина OsmC, FeS-шаперона SufC и тиоредоксина. Это может быть результатом двух причин. Во-первых, тепловой стресс может служить сигналом начала воспаления, в процессе которого происходит выделение активных форм кислорода. Индукция ответа на окислительный стресс позволяет, таким образом, *M. gallisepticum* заранее подготовиться к ответу хозяина. Во-вторых, сам тепловой стресс может вызывать окислительный стресс. Это может происходить через активацию НАДН-оксидазы. Этот фермент может генерировать активные формы кислорода в процессе сброса электронов с НАДН на кислород как побочные продукты. Таким образом, попытка *M. gallisepticum* интенсифицировать метаболизм приводит к развитию окислительного стресса. В ответ на этот стресс начинают синтезироваться защитные белки.

Наиболее сильной реакцией *M. gallisepticum* на тепловой стресс на белковом уровне является уменьшение количества гемагглютининов VlhA. В популяции *M. gallisepticum* экспрессируется репертуар из нескольких белков VlhA. Для ряда гемагглютининов VlhA в тепловом стрессе 30 минут наблюдалось снижение представленности в 2-4 раза.

Уменьшение количества гемагглютининов VlhA, зафиксированное с помощью методов протеомики на физиологическом уровне должно приводить к снижению клеточной адгезии. Для проверки этой гипотезы был проведён тест на гемагглютинацию куриных эритроцитов. В результате было установлено, что

после прогрева клетки действительно снижают способность к гемагглютинации. Снижение составляло порядка 4-6 раз, что соответствует наблюдаемому снижению представленности гемагглютининов (Рисунок 34).

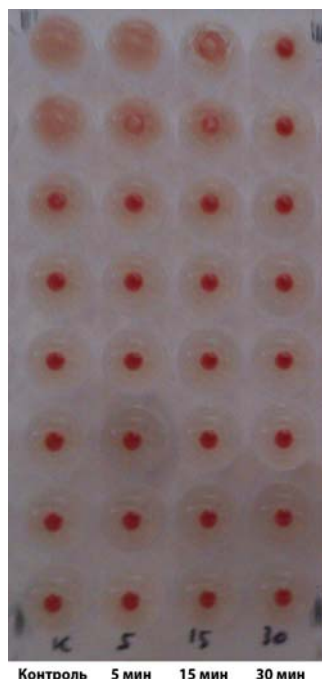


Рисунок 34. Тест на гемагглютинацию с клетками *M. gallisepticum* после теплового стресса. Сверху вниз идут серии двукратных разведений клеток *M. gallisepticum*. По горизонтали располагаются условия, слева направо: контроль, тепловой стресс 5 мин, 15 мин, 30 мин. Видно снижение гемагглютинации после теплового стресса около 4-6 раз.

Было проведено исследование влияния ингибиторов на выживаемость *M. gallisepticum* при тепловом стрессе. Для этого определялась сублетальная температура (см. Материалы и методы) после обработки сублетальными дозами ингибиторов – СССР, резерпина и новобиоцина (Рисунок 35). В результате было установлено, что после обработки СССР и резерпином сублетальная температура падает с 46С до 39С, при том что клетки в норме растут при 37С. Обработка резерпином снижает сублетальную температуру до 43С. Из этих наблюдений следует несколько выводов. Во-первых, как было показано выше, новобиоцин ингибирует транскрипцию через релаксацию геномной ДНК. Это означает, что транскрипция важна для выживания при тепловом стрессе. Влияние СССР может быть двояким. С одной стороны, СССР непосредственно действует на мембранный потенциал, с другой стороны, косвенно на потенциал-зависимый мембранный транспорт. Точно неизвестно, какие транспортёры *M. gallisepticum* зависят от мембранного потенциала. Резерпин ингибирует АВС-транспортёры и

его действие, вероятно, обусловлено ингибированием мембранного транспорта. У *M. gallisepticum* существует также как минимум один внутриклеточный белок с ABC-кассетой – FeS-шаперон SufC, который задействован в тепловом стрессе. Возможно, воздействие резерпина также связано с ингибированием SufC.

Важность мембранного транспорта в тепловом стрессе была проверена экспериментально. Для этого тепловой стресс проводился в неполной среде, без глюкозы, сыворотки и дрожжевого диализата, но с добавлением триптозы. В неполную среду добавлялись разные компоненты, включая глюкозу, цистеин и спермидин. Цистеин был выбран как легко проникающий в клетку и физиологичный восстановитель исходя из гипотезы, что тепловой стресс вызывает также окислительный. Спермидин был выбран по той причине, что соответствующий транспортёр увеличивает представленность по данным двумерного электрофореза. Глюкоза важна как источник АТФ и других трифосфатов для множества клеточных процессов – транскрипции, трансляции, мембранного транспорта и работы шаперонов. В результате было установлено, что минимальный состав среды, в которой выживаемость *M. gallisepticum* не ниже, чем в полной среде, включает неполную среду с добавлением цистеина и глюкозы. При этом оказалось, что спермидин ухудшает выживаемость. Таким образом, для выживания при тепловом стрессе *M. gallisepticum* требуется транспорт глюкозы и цистеина, а также, возможно, пептидов триптозы. Транспортёры аминокислот и пептидов плохо аннотированы в геноме *M. gallisepticum* и, вообще, вызывают сложность при аннотации, поэтому неизвестно какой именно транспортёр участвует в транспорте цистеина. Поскольку подавляющее большинство транспортёров *M. gallisepticum* – ABC-транспортёры, исключение составляют лишь PTS-транспортёры, то цистеин, вероятнее всего, переносится в клетку через ABC-транспортёр.



Рисунок 35. Роль компонентов среды для выживания *M. gallisepticum* в тепловом стрессе. На фотографии представлены культуры *M. gallisepticum* подвергнутые тепловому стрессу в неполной среде (без глюкозы, сыворотки и дрожжевого диализата) с добавлением разных компонентов (глюкоза, цистеин и спермидин) и пересеянные на среду с индикатором (аналогично определению сублетальных доз, см. Материалы и методы). Видно, что наилучшая выживаемость достигается при сочетании глюкозы и цистеина.

3.4. Модель стрессовой адаптации *M. gallisepticum*

На основе вышеописанных результатов можно построить модель адаптации микоплазмы к тепловому стрессу. Тепловой стресс, по-видимому, является наиболее физиологически значимым для *M. gallisepticum*. По-видимому, через тепловой стресс происходит восприятие воспалительного процесса, что влечёт за собой комплексную перестройку физиологии клетки, т.е. он является триггером процесса адаптации. Комплекс адаптивных изменений включает непосредственно связанные с ответом на тепловой стресс – синтез шаперонов, транспорт глюкозы и синтез АТФ для работы синтетических процессов и самих шаперонов. Также, параллельно происходит адаптация к окислительному стрессу, что с физиологической точки зрения важно, поскольку первый этап воспалительного ответа включает атаку активными формами кислорода. Для защиты от окислительного стресса *M. gallisepticum* синтезирует пероксиредоксины и FeS-шапероны и тиоредоксины, а также закачивает внутрь клетки восстановители, одним из которых является цистеин. По-видимому, при тепловом стрессе происходит интенсификация метаболизма, и гликолиз идёт преимущественно до

ацетата, а не лактата. Ключевым ферментом, регулирующим направление пути утилизации глюкозы, по-видимому, является НАДН-оксидаза, представленность которой увеличивается по данным двумерного электрофореза. Её активность также может приводить к образованию активных форм кислорода и быть источником окислительного стресса.

При тепловом стрессе происходит глобальное изменение профиля транскрипции. При этом включаются «спящие» промоторы и, по-видимому, часть изменений зависит не от транскрипционных факторов, а структуры самих промоторов. При этом происходит конкуренция активировавшихся «спящих» промоторов с уже работающими. В результате происходит вытеснение РНК-полимеразы с ряда промоторов, что наблюдается как множественное падение транскрипции. Наблюдаемое глобальное изменение транскрипции носит, скорее, неспецифический характер, в отличие от других типов стресса. Помимо этого, часть сильных транскрипционных изменений при тепловом стрессе, по-видимому, является результатом ответа на окислительный стресс и регулируется через специфический сенсор этого типа стресса. Его природа пока остаётся неизвестной.

Стрессовый ответ зависит от суперскрученности геномной ДНК, вероятно, обуславливающей возможность протекания транскрипции. При релаксации геномной ДНК существующих защитных механизмов недостаточно для выживания. Другим важным компонентом ответа на тепловой стресс является сброс поверхностных антигенов. Это может иметь двоякое физиологическое значение. Во-первых, таким образом происходит уход от иммунного ответа. Во-вторых, функция мембранных антигенов – преимущественно прикрепление к субстрату. При их потере клетки получают возможность распространяться по организму хозяина. Таким образом, при иммунной атаке *M. gallisepticum* стремится стать невидимой для иммунной системы и переместиться в другую часть организма хозяина.

4. Заключение

Настоящая работа является первым системным исследованием стрессового ответа, охватывающим все уровни адаптации, включая транскрипцию, трансляцию, и физиологию клетки. В данном исследовании изучение стрессовой адаптации проводилось на примере *Mycoplasma gallisepticum* – бактерии с ограниченным геномом, близким по своей организации к минимальному геному. В настоящей работе мы провели секвенирование генома *M. gallisepticum* S6, и полногеномное картирование транскрипционных единиц, включая промоторы и опероны. Мы разработали технологии подготовки библиотек кДНК, обогащённых 5'-концевыми последовательностями РНК и нормализации библиотек кДНК. Мы провели транскрипционное профилирование *M. gallisepticum* в разных стрессовых состояниях, включая логарифмическую и стационарную фазу роста, а также тепловой, окислительный и осмотический стресс. В результате картирования сайтов инициации транскрипции мы построили модель промотора *M. gallisepticum*. Мы обнаружили новые гены, задействованные в ответе на стрессовые условия. Мы исследовали ответ *M. gallisepticum* на тепловой стресс на протеомном уровне. Некоторые протеомные данные (см. ниже) мы верифицировали с помощью реакции гемагглютинации. Мы провели ингибиторный анализ с использованием ингибиторов ДНК-гиразы, АВС-транспортёров и протонного ионофора. Мы установили ряд питательных веществ, необходимых для выживания *M. gallisepticum* в тепловом стрессе.

В результате мы обнаружили гены, участвующие в ответе на соответствующие типы стресса. Мы показали, что в тепловом стрессе происходит множественная активация дополнительных промоторов и возрастание антисмысловой транскрипции. Таким образом, глобальное изменение транскрипционного профиля, наблюдаемое в тепловом стрессе, объясняется, по-видимому, изменением физико-химических свойств промоторов при повышенной

температуре и последующей конкуренцией между промоторами. Ингибиторный анализ показал, что глобальное изменение транскрипционного профиля в стационарной фазе вызвано, по-видимому, релаксацией геномной ДНК. Мы показали, что тепловой стресс вызывает уменьшение представленности поверхностных антигенов (гемагглютининов), а также увеличение представленности белков не только теплового, но и окислительного стресса. Таким образом, можно заключить, что тепловой стресс является сигналом, с помощью которого *M. gallisepticum* воспринимает начало воспалительного процесса и запускает соответствующие адаптивные механизмы. Мы обнаружили, что для выживания *M. gallisepticum* в тепловом стрессе нужен мембранный транспорт. В частности, клеткам требуются пептиды, глюкоза и цистеин. Мы показали, что *M. gallisepticum* обладает механизмом межклеточного сигналинга, работающего при тепловом стрессе.

Работа поддержана грантом РФФИ 12-04-31696 «Поиск новых систем регуляции экспрессии генов бактерий на модели *Mycoplasma gallisepticum*».

5. Выводы

- 1) Определена последовательность генома *M. gallisepticum* S6 (Идентификатор в геномной базе данных NCBI ASM21154v4).
- 2) Созданы *in vitro* биологические модели теплового, окислительного и осмотического стресса, стресса вызываемого новобиоцином, резерпином, карбонил-цианид 3-хлорфенилгидразоном.
- 3) Идентифицированы гены, меняющие уровень транскрипции в стрессовых условиях и в разных фазах роста культуры. Измерена и валидирована амплитуда изменения уровня транскрипции. Показано, что в ответе на тепловой стресс активируется транскрипция генов, кодирующих белки защиты от окислительного стресса. Построена карта функциональных единиц в геноме *M. gallisepticum*, включающая промоторы, терминаторы, опероны и антисмысловые РНК.
- 4) Идентифицированы белки *M. gallisepticum*, меняющие представленность в тепловом стрессе. Показано, что в тепловом стрессе у *M. gallisepticum* снижается представленность поверхностных антигенов и способность к гемагглютинации.

6. Список литературы

1. Wolf M. Phylogeny of Firmicutes with special reference to Mycoplasma (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004. Vol. 54, № 3. P. 871–875.
2. Razin S. The Mycoplasmas // Microbiological reviews. 1978. Vol. 42, № 2. P. 414–470.
3. Nocard E.I.E., Roux E. The microbe of pleuropneumonia. // Annales de l'Institut Pasteur. 1896. Vol. 12. P. 240–262.
4. Edward D.G., Freundt E.A. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. // Journal of general microbiology. 1956. Vol. 14, № 1. P. 197–207.
5. Hatchel J.M., Balish M.F. Attachment organelle ultrastructure correlates with phylogeny, not gliding motility properties, in Mycoplasma pneumoniae relatives. // Microbiology (Reading, England). 2008. Vol. 154, № Pt 1. P. 286–295.
6. Razin S., Yogev D. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas // Microbiology and Molecular Biology. 1998. Vol. 62, № 4. P. 1094–1156.
7. Sirand-Pugnet P. et al. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. // PLoS genetics. 2007. Vol. 3, № 5. P. e75.
8. Koonin E.V., Wolf Y.I. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. // Nucleic acids research. 2008. Vol. 36. P. 6688–6719.
9. Fraser C.M. et al. The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium. // Science. 1995. Vol. 270. P. 397–403.
10. Mushegian A.R., Koonin E.V. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. // Proc Natl Acad Sci U S A. 1996. Vol. 93, № 19. P. 10268–10273.
11. Harris J.K. et al. The Genetic Core of the Universal Ancestor. // Genome Research. 2003. Vol. 13, № 3. P. 407–412.

12. Hutchison III C.A. Global Transposon Mutagenesis and a Minimal Mycoplasma Genome. // Science. 1999. Vol. 286, № 5447. P. 2165–2169.
13. Fisunov G., Alexeev D., Bazaleev N. Core proteome of the minimal cell: comparative proteomics of three mollicute species // PloS one. 2011. Vol. 6, № 7. P. e21964.
14. Pereyre S. et al. Life on arginine for Mycoplasma hominis: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. // PLoS genetics. 2009. Vol. 5, № 10. P. e1000677.
15. Hasselbring B.M. et al. Terminal organelle development in the cell wall-less bacterium Mycoplasma pneumoniae. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006. Vol. 103, № 44. P. 16478–16483.
16. Carvalho F.M. et al. DNA repair in reduced genome: the Mycoplasma model. // Gene. 2005. Vol. 360, № 2. P. 111–119.
17. Weiner III J. Transcription profiles of the bacterium Mycoplasma pneumoniae grown at different temperatures // Nucleic Acids Research. 2003. Vol. 31, № 21. P. 6306–6320.
18. Madsen M.L. et al. Transcriptional Profiling of Mycoplasma hyopneumoniae during Heat Shock Using Microarrays †. 2006. Vol. 74, № 1. P. 160–166.
19. Musatovova O., Dhandayuthapani S., Baseman J.B. Transcriptional Heat Shock Response in the Smallest Known Self-Replicating Cell, Mycoplasma genitalium // Journal of Bacteriology. 2006. Vol. 188, № 8. P. 2845–2855.
20. Güell M. et al. Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. // Science (New York, N.Y.). 2009. Vol. 326, № 5957. P. 1268–1271.
21. Maier T., Schmidt A., Güell M. Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium // Molecular systems 2011. Vol. 7, № 511. P. 511.
22. Peters I.R. et al. RNase P RNA gene (rnpB) phylogeny of Hemoplasmas and other Mycoplasma species. // Journal of clinical microbiology. 2008. Vol. 46, № 5. P. 1873–1877.
23. Freundt E.A. et al. Proposal for Elevation of the Family Acholeplasmataceae to Ordinal Rank : A c h o l e p l a s m a t a l e s // International journal of systematic bacteriology. 1984. Vol. 34. P. 346–349.

24. Robinson I.M., Freundt E.A. Proposal for an Amended Classification of Anaerobic Mollicutes // International journal of systematic bacteriology. 1987. Vol. 37. P. 78–81.
25. Tully J.G. et al. Revised Taxonomy of the Class Mollicutes : Proposed Elevation of a Monophyletic Cluster of Arthropod-Associated Mollicutes to Ordinal Rank (Entomoplasmatales ord . nov .), with Provision for Familial Rank To Separate Species with Descriptions of the Orde // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1993. Vol. 43. P. 378–385.
26. Antunes A. et al. A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea. // Journal of bacteriology. 2008. Vol. 190, № 10. P. 3580–3587.
27. Genevaux P., Georgopoulos C., Kelley W.L. The Hsp70 chaperone machines of Escherichia coli: a paradigm for the repartition of chaperone functions. // Molecular microbiology. 2007. Vol. 66, № 4. P. 840–857.
28. Horwich A.L. et al. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. // Annual review of cell and developmental biology. 2007. Vol. 23. P. 115–145.
29. Grallert H., Buchner J. Review: a structural view of the GroE chaperone cycle. // Journal of structural biology. 2001. Vol. 135, № 2. P. 95–103.
30. Lee S. et al. The ClpB/Hsp104 molecular chaperone-a protein disaggregating machine. // Journal of structural biology. 2004. Vol. 146, № 1-2. P. 99–105.
31. Yu A.Y.H., Houry W. a. ClpP: a distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. // FEBS letters. 2007. Vol. 581, № 19. P. 3749–3757.
32. Joshi S.A. et al. Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. // Nature structural & molecular biology. 2004. Vol. 11, № 5. P. 404–411.
33. Sousa M.C. et al. Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. // Cell. 2000. Vol. 103, № 4. P. 633–643.
34. Lee I., Suzuki C.K. Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease-Functional mechanics of the ATP-dependent Lon proteaselessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. 2009. Vol. 1784, № 5. P. 727–735.
35. Kramer G. et al. L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. // Nature. 2002. Vol. 419, № 6903. P. 171–174.

36. Ratajczak E., Zietkiewicz S., Liberek K. Distinct activities of *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB promote efficient protein disaggregation. // *Journal of molecular biology*. Elsevier Ltd, 2009. Vol. 386, № 1. P. 178–189.
37. Jakob U. et al. Chaperone activity with a redox switch. // *Cell*. 1999. Vol. 96, № 3. P. 341–352.
38. Ollagnier-de Choudens S. et al. SufA from *Erwinia chrysanthemi*. Characterization of a scaffold protein required for iron-sulfur cluster assembly. // *The Journal of biological chemistry*. 2003. Vol. 278, № 20. P. 17993–18001.
39. Nachin L. et al. SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. // *The EMBO journal*. 2003. Vol. 22, № 3. P. 427–437.
40. Outten F.W. et al. The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. // *The Journal of biological chemistry*. 2003. Vol. 278, № 46. P. 45713–45719.
41. Coba de la Peña T. et al. Flavodoxin overexpression confers tolerance to oxidative stress in beneficial soil bacteria and improves survival in the presence of the herbicides paraquat and atrazine. // *Journal of applied microbiology*. 2013. Vol. 115, № 1. P. 236–246.
42. Liu G. et al. The *Escherichia coli* azoreductase AzoR Is involved in resistance to thiol-specific stress caused by electrophilic quinones. // *Journal of bacteriology*. 2009. Vol. 191, № 20. P. 6394–6400.
43. Wood Z. a et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. // *Trends in biochemical sciences*. 2003. Vol. 28, № 1. P. 32–40.
44. Jaeger T. et al. Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2004. Vol. 423, № 1. P. 182–191.
45. Atichartpongkul S. et al. Bacterial Ohr and OsmC paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression. // *Microbiology (Reading, England)*. 2001. Vol. 147, № Pt 7. P. 1775–1782.
46. Oliveira M. a et al. Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from *Xylella fastidiosa*. // *Journal of molecular biology*. 2006. Vol. 359, № 2. P. 433–445.

47. Ezraty B., Aussel L., Barras F. Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. // *Biochimica et biophysica acta*. 2005. Vol. 1703, № 2. P. 221–229.
48. Boschi-Muller S., Gand A., Branlant G. The methionine sulfoxide reductases: Catalysis and substrate specificities. // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008. Vol. 474, № 2. P. 266–273.
49. Whittaker J.W. Non-heme manganese catalase--the “other” catalase. // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012. Vol. 525, № 2. P. 111–120.
50. Lynch M., Kuramitsu H. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. // *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000. Vol. 2, № 10. P. 1245–1255.
51. Calhoun L.N., Kwon Y.M. Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review. // *Journal of applied microbiology*. 2011. Vol. 110, № 2. P. 375–386.
52. Wood J.M. Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. // *Annual review of microbiology*. 2011. Vol. 65. P. 215–238.
53. Guisbert E. et al. Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. // *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2008. Vol. 72, № 3. P. 545–554.
54. Ho T.D., Ellermeier C.D. Extra cytoplasmic function σ factor activation. // *Current opinion in microbiology*. 2012. Vol. 15, № 2. P. 182–188.
55. Haldenwang W.G. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. // *Microbiological reviews*. 1995. Vol. 59, № 1. P. 1–30.
56. Quin M.B. et al. The bacterial stressosome: a modular system that has been adapted to control secondary messenger signaling. // *Structure (London, England : 1993)*. 2012. Vol. 20, № 2. P. 350–363.
57. de Saro F.J.L. Expression, Abundance, and RNA Polymerase Binding Properties of the delta Factor of *Bacillus subtilis* // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274, № 22. P. 15953–15958.
58. Xue X. et al. The delta subunit of RNA polymerase, RpoE, is a global modulator of *Streptococcus mutans* environmental adaptation. // *Journal of bacteriology*. 2010. Vol. 192, № 19. P. 5081–5092.
59. Ohta T. et al. Atomic Force Microscopy Proposes a Novel Model for Stem-Loop Structure That Binds a Heat Shock Protein in the *Staphylococcus aureus* HSP70

- Operon // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1996. Vol. 734. P. 730–734.
60. Chang L.-J. et al. Mycoplasmas regulate the expression of heat-shock protein genes through CIRCE-HrcA interactions. // Biochemical and biophysical research communications. 2008. Vol. 367, № 1. P. 213–218.
 61. Lee J.-W., Helmann J.D. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. // Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine. 2007. Vol. 20, № 3-4. P. 485–499.
 62. Ma Z., Faulkner M.J., Helmann J.D. Origins of specificity and cross-talk in metal ion sensing by *Bacillus subtilis* Fur. // Molecular microbiology. 2012. Vol. 86, № 5. P. 1144–1155.
 63. Baichoo N., Helmann J.D. Recognition of DNA by Fur: a Reinterpretation of the Fur Box Consensus Sequence. 2002. Vol. 184, № 21. P. 5826–5832.
 64. Chiang S.M., Schellhorn H.E. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. // Archives of biochemistry and biophysics. Elsevier Inc., 2012. Vol. 525, № 2. P. 161–169.
 65. Roberts J.W. Promoter-specific control of *E. coli* RNA polymerase by ppGpp and a general transcription factor. // Genes & development. 2009. Vol. 23, № 2. P. 143–146.
 66. Wolz C., Geiger T., Goerke C. The synthesis and function of the alarmone (p)ppGpp in firmicutes. // International journal of medical microbiology : IJMM. Elsevier, 2010. Vol. 300, № 2-3. P. 142–147.
 67. Srivatsan A., Wang J.D. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. // Current opinion in microbiology. 2008. Vol. 11, № 2. P. 100–105.
 68. You C. et al. Spx mediates oxidative stress regulation of the methionine sulfoxide reductases operon in *Bacillus subtilis*. // BMC microbiology. 2008. Vol. 8. P. 128.
 69. Bikard D. et al. Folded DNA in action: hairpin formation and biological functions in prokaryotes. // Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. 2010. Vol. 74, № 4. P. 570–588.
 70. Niehus E., Cheng E., Tan M. DNA supercoiling-dependent gene regulation in *Chlamydia*. // Journal of bacteriology. 2008. Vol. 190, № 19. P. 6419–6427.

71. Horwitz M.S.Z., Loeb L.A. An E. coli Promoter That Regulates Transcription by DNA Superhelix-Induced Cruciform Extrusion // Science. 1988. Vol. 165, № 1981. P. 5–7.
72. Nocker A. et al. A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes. // Nucleic acids research. 2001. Vol. 29, № 23. P. 4800–4807.
73. Rinnenthal J. et al. Direct observation of the temperature-induced melting process of the Salmonella fourU RNA thermometer at base-pair resolution. // Nucleic acids research. 2010. Vol. 38, № 11. P. 3834–3847.
74. Schmid A.K. et al. HspR is a global negative regulator of heat shock gene expression in Deinococcus radiodurans. // Molecular microbiology. 2005. Vol. 55, № 5. P. 1579–1590.
75. Schumann W. The Bacillus subtilis heat shock stimulon. // Cell stress & chaperones. 2003. Vol. 8, № 3. P. 207–217.
76. Palm G.J. et al. Structural insights into the redox-switch mechanism of the MarR/DUF24-type regulator HypR. // Nucleic acids research. 2012. Vol. 40, № 9. P. 4178–4192.
77. Fujikawa M., Kobayashi K., Kozawa T. Direct oxidation of the [2Fe-2S] cluster in SoxR protein by superoxide: distinct differential sensitivity to superoxide-mediated signal transduction. // The Journal of biological chemistry. 2012. Vol. 287, № 42. P. 35702–35708.
78. Gorbachev A.Y. et al. DNA repair in Mycoplasma gallisepticum // BMC Genomics. 2013. Vol. 14, № 1. P. 726.
79. SantaLucia J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998. Vol. 95, № 4. P. 1460–1465.
80. Wodke J. a H. et al. Dissecting the energy metabolism in Mycoplasma pneumoniae through genome-scale metabolic modeling. // Molecular systems biology. 2013. Vol. 9, № 653. P. 653.
81. Demina I.A. et al. Comparative proteomic characteristic of mycoplasmas (Mollicutes) // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2011. Vol. 37, № 1. P. 61–70.
82. Jaffe J.D. et al. The complete genome and proteome of Mycoplasma mobile. // Genome research. 2004. Vol. 14, № 8. P. 1447–1461.

83. Cookson N.A. et al. Queueing up for enzymatic processing: correlated signaling through coupled degradation. // *Molecular systems biology*. 2011. Vol. 7, № 561. P. 561.

Публикации по теме работы

1. Fisunov G. Y., Alexeev D. G., Bazaleev N. A., Ladygina V. G., Galyamina M. A., Kondratov I. G., Zhukova N. A., Serebryakova M. V., Demina I. A., Govorun V. M. Core proteome of the minimal cell: comparative proteomics of three mollicute species. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 7. P. 1-10 (e21964).
2. Gorbachev A. Y., Fisunov G. Y., Izraelson M., Evsyutina D. V., Mazin P. V., Alexeev D. G., Pobeguts O. V., Gorshkova T. N., Kovalchuk S. I., Kamashev D. E., Govorun V. M. DNA repair in *Mycoplasma gallisepticum*. // *BMC Genomics*. 2013. V. 14. № 1. P. 726-737.
3. Vanyushkina A. A., Fisunov G. Y., Gorbachev A. Y., Kamashev D. E., Govorun V. M. Metabolomic Analysis of Three Mollicute Species. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 3. P. 1-16 (e89312)
4. Дёмина И. А., Серебрякова М. В., Ладыгина В. Г., Галямина М. А., Жукова Н. А., Алексеев Д. Г., Фисунов Г. Ю., Говорун В. М. Сравнительная протеомная характеристика микоплазм (молликут). // *Биорг. химия*. 2011. Т. 37 № 1 С. 70-80.
5. Fisunov G. Y., Alexeev D. G., Demina I. A., Kondratov I. G., Serebryakova M. V., Govorun V. M. Reconstruction of the minimal cell proteome by comparative analysis of proteomes from three mycoplasma species. // *Systems Biology of Microorganisms* (Париж, Франция, 22-24 марта 2010), p. 98
6. Фисунов Г. Ю., Горбачёв А. Ю., Дёмина И. А., Говорун В. М. Регуляция экспрессии генов у *Mycoplasma gallisepticum* – бактерии с редуцированным геномом. // *Acta Naturae*. 2013. спецвыпуск №1 С. 45-46 (Тезисы конференции «Постгеномные методы исследования в биологии и медицине», Казань, 22-24 ноября 2012)
7. Gorbachev A., Fisunov G., Govorun V. Regulation of gene expression in *Mycoplasma gallisepticum*: heat-stress model // *EMBO Conference From Functional Genomics to Systems Biology* (Гейдельберг, 17-20 ноября 2012), p. 156
8. Gorbachev A., Fisunov G., Govorun V. Regulation of gene expression in *Mycoplasma gallisepticum*: heat-stress model // *38th FEBS Congress* (Санкт-Петербург, 6-11 июля 2013), p. 560

7. Список иллюстраций

- Рисунок 1. Функциональный состав белков минимальной клетки, идентифицированных методом сравнительной протеомики.
- Рисунок 2. Кладограмма молликут с полностью известными геномами на основе 16S рРНК.
- Рисунок 3. Кинетика роста культуры *M. gallisepticum* методом количественной ПЦР.
- Рисунок 4. Электрофоретический профиль разделения тотальной РНК.
- Рисунок 5. Схема получения библиотеки, обогащённой 5'-концевыми последовательностями.
- Рисунок 6. Характеристика равномерности покрытия при использовании разных типов фрагментации РНК.
- Рисунок 7. Профили электрофоретического разделения РНК до (1) и после (2) удаления рРНК с помощью метода рибоминус – гибридизации с зондами против рРНК.
- Рисунок 8. Влияние метода нормализации на количественную представленность транскриптов.
- Рисунок 9. Искажение представленности транскриптов в процессе секвенирования.
- Рисунок 10. Корреляция количественных данных по Спирману между биологическими повторами в разных состояниях.
- Рисунок 11. Валидация транскриптомных данных методом количественной ПЦР в реальном времени методом ранговой корреляции по Спирману, значение коэффициента корреляции приведено на каждом графике (ρ).
- Рисунок 12. Пример покрытия, получаемого в ходе транскриптомного анализа. Сверху идёт разметка генома (красным).
- Рисунок 13. Сравнение искажения представленности транскриптов, вносимого в ходе секвенирования, в стандартных и 5'-обогащённых библиотеках.
- Рисунок 14. Строение промоторов со спейсерами разной длины.
- Рисунок 15. Положение лучшего вхождения весовой матрицы (PWM) ТАТА-бокса для 829 лучших пиков в 5'-обогащённых библиотеках.
- Рисунок 16. Корреляция между изменением относительной высоты пика в 5'-обогащённой библиотеке и изменением относительного покрытия соответствующего гена.
- Рисунок 17. Сравнение доменной структуры сигма-факторов *B. subtilis* и *M. gallisepticum* на основе данных NCBI CDD.
- Рисунок 18. Строение сильного промотора *M. gallisepticum*. Для построения лого использовались промоторы рРНК и тРНК.
- Рисунок 19. Строение сайта связывания рибосомы *M. gallisepticum*.
- Рисунок 20. Положение лучшего вхождения весовой матрицы (PWM) сайта связывания рибосомы для всех аннотированных открытых рамок считывания в геноме *M. gallisepticum*.
- Рисунок 21. Положение сайта инициации транскрипции относительно старт-кодона.
- Рисунок 22. «Лестничная» экспрессия непрерывно покрытых областей.
- Рисунок 23. Пример антисмысловой РНК *M. gallisepticum*.
- Рисунок 24. Паттерны изменения экспрессии генов *M. gallisepticum* при ответе на тепловой стресс.
- Рисунок 25. Мембранная локализация доменов в сериновых протеазах семейства субтилизина *M. gallisepticum*.
- Рисунок 26. Пути метаболизма нуклеотидов, гены ферментов которых увеличивают транскрипцию при тепловом стрессе.
- Рисунок 27. Индукция РНК 0578 в разных условиях.
- Рисунок 28. Влияние генетических детерминант в промоторе на его транскрипцию в тепловом стрессе.
- Рисунок 29. Схема энергетического метаболизма *M. gallisepticum*.

Рисунок 30. Количество генов, увеличивающих (А) и уменьшающих (В) транскрипцию в разных типах стресса.

Рисунок 31. Доля генов с неизвестной функцией, участвующих в ответе на разные типы стресса.

Рисунок 32. Измерение концентрации АТФ в клетках *M. gallisepticum* при тепловом стрессе и обработке СССР.

Рисунок 33. Доля генов кластеров ортологичных групп (COG), входящих в функциональное ядро молликут и задействованных в ответе на стресс.

Рисунок 34. Тест на гемагглютинацию с клетками *M. gallisepticum* после теплового стресса.

Рисунок 35. Роль компонентов среды для выживания *M. gallisepticum* в тепловом стрессе.

Таблица 1. Сублетальные дозы воздействий на *M. gallisepticum*, определённые в данной работе.

Таблица 2. Влияние метода нормализации и фрагментации на представленность кДНК разных классов РНК в транскриптомных библиотеках.

8. Приложение

8.1. Транскрипционное профилирование генов *M. gallisepticum* методом высокопроизводительного секвенирования

Локус	Изм.	Функция
GCW_00005	1,52	белок сегрегации хромосом ParA
GCW_00045	-1,41	16 rRNA метилтрансфераза
GCW_00050	-1,29	дифосфотидил-2C-метил-D-эритритол-2-фосфат синтаза
GCW_00085	1,26	ферритин
GCW_00140	-1,31	белок клеточного деления FtsH
GCW_00145	-2,08	дигидроксиацетон киназа
GCW_00200	1,00	гипотетический белок
GCW_00205	-1,06	нуклеаза системы эксцизионной репарации uvrB
GCW_00215	-1,87	ABC-транспортёр фосфата, пермеаза
GCW_00220	-1,96	ABC-транспортёр фосфата, АТФаза
GCW_00225	-1,52	ABC-транспортёр фосфата
GCW_00230	1,07	нуклеотид-дифосфат редуктаза α -субъединица
GCW_00245	1,30	тимидилат-синтаза
GCW_00275	-1,67	30S рибосомальный белок S10
GCW_00280	-1,05	50S рибосомальный белок L3
GCW_00440	1,07	альтернативный сигма-фактор
GCW_00465	1,21	гипотетический белок, PolC домен
GCW_00485	-1,03	фактор рециклизации рибосом
GCW_00490	-1,98	фосфатидат цитидилтрансфераза
GCW_00495	-1,25	1-дезоксид-D-ксилоулозо-5-фосфат редуктоизомераза
GCW_00515	1,18	гипотетический протеин
GCW_00520	1,35	мембранный белок
GCW_00545	1,20	ABC-транспортёр ABC-транспортёр системы множественной лекарственной
GCW_00550	1,21	устойчивости
GCW_00565	1,05	белок с ароматическим кластером
GCW_00570	1,42	гипотетический белок
GCW_00575	1,99	гипотетический белок
GCW_00585	2,03	сериновая протеаза
GCW_00590	1,47	мембранный белок
GCW_00605	-1,89	фактор элонгации транскрипции NusA
GCW_00610	-2,03	гипотетический белок
GCW_00615	-1,69	фактор инициации трансляции IF-2
GCW_00620	-1,28	фактор связывания рибосом A
GCW_00625	-1,42	гипотетический белок
GCW_00705	-1,33	метионил-тРНК формилтрансфераза
GCW_00710	-1,04	гипотетический белок
GCW_00845	1,07	шаперон DnaJ
GCW_00865	1,47	шаперон DnaJ
GCW_00890	-1,26	ГТФ-связывающий белок, гомолог RAS
GCW_00960	1,50	пептидаза S8
GCW_00965	1,47	мембранный белок
GCW_00975	2,33	мембранный белок
GCW_01080	-1,00	СТР синтаза
GCW_01140	1,39	ДНК-связывающий ферритиноподобный белок
GCW_01145	-2,61	вариабельный гемагглютинин VlhA

GCW_01150	-1,26	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01155	-1,72	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01170	-1,18	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01175	-1,57	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01195	-1,51	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01210	1,28	дезоксинуридин 5'-трифосфат нуклеотидогидролаза
GCW_01220	-1,17	псевдоуридин синтаза
GCW_01255	1,16	гипотетический белок
GCW_01270	3,28	высокоаффинный ABC транспортёр HatA
GCW_01275	3,45	высокоаффинный ABC транспортёр HatB
GCW_01290	1,37	гипотетический белок
GCW_01295	1,65	гипотетический белок
GCW_01300	2,40	гипотетический белок
GCW_01305	1,09	переносчик жирных кислот
GCW_01505	1,07	гипотетический белок
GCW_01530	1,05	транспозаза
GCW_01535	1,51	флаводоксин
GCW_01540	1,56	гипотетический белок
GCW_01580	-2,48	металл-зависимая гидролаза
GCW_01675	1,38	гипотетический белок
GCW_01695	-2,75	4-гидрокси-3-метилбут-2-ен-1-ил дифосфатсинтаза
GCW_01700	-2,14	урацил фосфорибозилтрансфераза
GCW_01815	-1,14	тРНК (гуанидин-N(7))-метилтрансфераза
GCW_01875	-1,91	аргинин-деиминаза
GCW_01880	-1,47	тиоредоксин-НАДФ редуктаза
GCW_01895	1,16	эстераза
GCW_01945	-1,58	гипотетический белок
GCW_01960	-1,44	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01975	2,70	бета-фосфоглюкомутаза
GCW_01985	1,53	мальтозофосфорилаза
GCW_01990	1,63	гипотетический белок
GCW_01995	1,61	гипотетический белок
GCW_02005	-1,13	репрессор белков теплового шока HrcA
GCW_02080	1,05	50S рибосомальный белок L27
GCW_02095	1,00	гипотетический белок
GCW_02105	2,15	протеаза Lon
GCW_02110	-1,00	ABC транспортёр, пермеаза
GCW_02150	1,31	белок семейства RDD
GCW_02240	1,91	белок клеточного деления FtsA
GCW_02245	1,36	16S рРНК метилтрансфераза
GCW_02250	1,14	белок клеточного деления MraZ
GCW_02285	1,37	гипотетический белок
GCW_02290	1,44	гипотетический белок
GCW_02300	2,11	АТФаза AAA-типа
GCW_02350	1,17	транскрипционный фактор XRE семейства
GCW_02355	1,79	Система рестрикции-модификации, субъединица M
GCW_02360	1,57	Система рестрикции-модификации, субъединица S
GCW_02365	1,12	Система рестрикции-модификации, субъединица R
GCW_02370	1,62	гипотетический белок
GCW_02375	-1,66	гипотетический белок
GCW_02380	-1,26	гипотетический белок
GCW_02390	-1,77	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02405	-1,45	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02410	-2,17	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02440	-2,19	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02455	-1,67	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02470	1,10	гипотетический белок

GCW_02485	-1,62	лейцил-тРНК синтетаза
GCW_02505	1,85	гипотетический белок
GCW_02520	-1,27	аминопептидаза
GCW_02525	-1,80	аминопептидаза
GCW_02530	-1,70	SsrA-связывающий белок
GCW_02535	-1,51	гипотетический белок
GCW_02565	-1,22	уридин-киназа
GCW_02570	-1,00	гипотетический белок
GCW_02580	-1,94	гипотетический белок
GCW_02635	1,01	транскрипционный регулятор семейства WhiA
GCW_02645	1,03	транскрипционный регулятор семейства GntR
GCW_02775	-2,51	дезоксигуанозин киназа
GCW_02780	-2,82	дезоксигуанозин киназа
GCW_02785	3,59	шаперон ClpB
GCW_02810	-1,82	псевдоуридин синтаза
GCW_02815	-1,29	рРНК метилтрансфераза
GCW_02855	-2,20	РНК-хеликаза
GCW_02930	-1,62	гипотетический белок
GCW_02975	1,17	30S рибосомальный белок S2
GCW_03015	-1,11	гипотетический белок
GCW_03040	1,07	30S рибосомальный белок S4
GCW_03070	2,33	гипотетический белок
GCW_03075	2,04	шаперон DnaK
GCW_03085	1,73	ионный канал
GCW_03090	1,30	механочувствительный канал высокой проводимости
GCW_03140	-1,20	компонент PTS системы
GCW_03215	1,23	гипотетический белок
GCW_03240	-1,62	гликозил-трансфераза
GCW_03250	-1,96	ДНК-праймаза
GCW_03255	-1,25	рибозо-фосфат пиррофосфокиназа
GCW_03285	1,02	фосфоглицерат мутаза
GCW_03290	1,17	триозофосфат изомераза
GCW_03335	-1,78	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03345	-1,35	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03350	-1,82	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03370	-2,16	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03470	1,59	аспарагин-синтаза
GCW_03580	-1,33	ГТФаза биогенеза рибосом RsgA
GCW_03585	-1,06	серин/треонин протеин-киназа
GCW_03605	-1,27	транспортёр MFS
GCW_03620	1,06	гипотетический белок
GCW_03645	1,22	транспозаза
GCW_03655	-3,38	гипотетический белок
GCW_03660	-3,03	гипотетический белок
GCW_03665	-2,30	гипотетический белок
GCW_03670	-1,62	гипотетический белок
GCW_03715	1,69	50S рибосомальный белок L11
GCW_03720	1,77	50S рибосомальный белок L1
GCW_03750	2,89	гипотетический белок
GCW_03765	-1,22	CRISPR-ассоциированный белок Cas1
GCW_03780	-1,31	рРНК метилтрансфераза
GCW_03785	-1,31	цистеинил-тРНК синтетаза
GCW_03790	1,70	гипотетический белок
GCW_03795	1,37	гипотетический белок
GCW_03800	1,54	пептидаза S8
GCW_03805	2,57	АТФ-аза семейства AAA
GCW_03815	1,15	Белок системы рестрикции-модификации, субъединица S

GCW_03895	1,14	гипотетический белок
GCW_03900	1,20	пептидаза
GCW_03930	-1,02	метионин-сульфоксид редуктаза A
GCW_03960	1,32	гипотетический белок
GCW_90017	1,22	ABC-транспортёр кобальта, АТФаза
GCW_90246	1,57	дезоксцитидилат дезаминаза и дигидрофолат редуктаза
GCW_90526	1,21	гипотетический белок
GCW_90556	1,07	
GCW_90644	1,03	транспозаза
GCW_90646	1,18	транспозаза
GCW_91142	-1,26	гипотетический белок
GCW_91181	-1,69	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_91203	1,04	пролипопротеин B
GCW_91276	2,16	высокоаффинный ABC транспортёр HatC
GCW_91455	-1,25	транспозаза
GCW_91851	1,04	гипотетический белок
GCW_91852	1,04	гипотетический белок
GCW_91946	-1,10	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_91947	-1,66	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_91948	-1,12	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_91988	1,66	Мальтозо/трегалозо фосфорилаза
GCW_92036	-2,01	фенилаланил-тРНК синтетаза, α -субъединица
GCW_92037	-1,39	фенилаланил-тРНК синтетаза, β -субъединица
GCW_92038	2,39	
GCW_92039	2,47	гипотетический белок
GCW_92117	-1,47	Ацил дегидратаза
GCW_92149	1,14	Хеликаза UvrD
GCW_92264	-1,59	Дигидрофолат редуктаза и белок сегрегации хромосом ScpA/B
GCW_92452	-1,37	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92453	-1,56	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92454	-1,36	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92456	-1,30	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92457	-2,22	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92579	-1,62	Ras-подобная ГТФаза
GCW_92658	1,19	S-аденозилметионин синтетаза
GCW_92659	1,29	S-аденозилметионин синтетаза
GCW_92996	1,57	гипотетический белок
GCW_93352	-1,64	гипотетический белок
GCW_93361	-1,10	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_93362	-2,23	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_93654	-3,86	гипотетический белок
GCW_93751	3,55	Сериновая протеаза семейства субтилизина
GCW_93752	3,71	белок ArgE семейства
GCW_93776	-1,58	гипотетический белок
GCW_93902	1,36	гипотетический белок
GCW_93946	1,73	гипотетический белок
GCW_93948	1,82	гипотетический белок
GCW_93958	1,27	гипотетический белок
GCW_93971	1,11	Бифункциональный белок RecA-НТФаза, АТФ-синтетаза α/β
GCW_99016	4,59	ABC-транспортёр, АТФаза/пермеаза
GCW_99018	1,01	ABC-транспортёр, АТФаза/пермеаза

Таблица 1. Открытые рамки считывания, значимо меняющие уровень транскрипции (двоичный логарифм относительного нормализованного покрытия) в тепловом стрессе 5 минут, (q -value<0,05).

Локус Изм. Функция

GCW_00015	4,56	гипотетический белок
GCW_00030	-1,42	50S рибосомальный белок L34
GCW_00035	-1,43	рибонуклеаза Р
GCW_00040	-1,58	белок системы транслокации белков YidC
GCW_00045	-1,50	16 rRNA метилтрансфераза
GCW_00055	-1,28	аргинил-т-РНК синтетаза
GCW_00075	-1,65	глицерол-3-фосфат дегидрогеназа
GCW_00085	1,52	ферритин
GCW_00095	-1,92	рибонуклеаза J
GCW_00110	1,13	ABC-транспортёр, пермеаза
GCW_00125	1,51	гипотетический белок
GCW_00145	-1,38	дигидроксиацетон киназа
GCW_00160	-1,02	транскетолаза
GCW_00170	-2,16	липопротеин
GCW_00175	-2,77	нуклеаза
GCW_00180	-2,47	ABC-транспортёр sn-глицерол-3-фосфата, АТФаза
GCW_00185	-2,04	ABC-транспортёр, пермеаза
GCW_00190	-1,51	ABC-транспортёр, пермеаза
GCW_00195	-1,42	гипотетический белок
GCW_00200	-1,15	гипотетический белок
GCW_00205	-1,97	нуклеаза системы эксцизионной репарации uvrB
GCW_00210	-1,53	ABC-транспортёр фосфата, субстрат-связывающая субъединица
GCW_00215	-2,22	ABC-транспортёр фосфата, пермеаза
GCW_00220	-2,13	ABC-транспортёр фосфата, АТФаза
GCW_00225	-2,04	ABC-транспортёр фосфата
GCW_00260	1,60	гипотетический белок
GCW_00275	-2,76	30S рибосомальный белок S10
GCW_00280	-1,84	50S рибосомальный белок L3
GCW_00285	-1,53	50S рибосомальный белок L4
GCW_00290	-1,53	50S рибосомальный белок L23
GCW_00295	-1,19	50S рибосомальный белок L2
GCW_00300	-1,65	30S рибосомальный белок S19
GCW_00305	-1,68	50S рибосомальный белок L22
GCW_00310	-1,40	30S рибосомальный белок S3
GCW_00315	-1,38	50S рибосомальный белок L16
GCW_00320	-1,97	50S рибосомальный белок L29
GCW_00325	-1,45	30S рибосомальный белок S17
GCW_00330	-1,23	50S рибосомальный белок L14
GCW_00335	-1,74	50S рибосомальный белок L24
GCW_00340	-1,32	50S рибосомальный белок L5
GCW_00345	-1,35	30S рибосомальный белок S14
GCW_00350	-1,24	30S рибосомальный белок S8
GCW_00355	-1,17	50S рибосомальный белок L6
GCW_00365	-1,14	30S рибосомальный белок S5
GCW_00405	1,43	гипотетический белок
GCW_00410	-2,59	лизил-тРНК синтетаза
GCW_00415	-1,76	шаперон DnaJ
GCW_00445	2,14	30S рибосомальный белок S15
GCW_00465	1,87	гипотетический белок, PolC домен
GCW_00470	1,13	нуклеаза системы эксцизионной репарации uvrA
GCW_00515	1,95	гипотетический протеин
GCW_00520	1,37	мембранный белок
GCW_00535	2,64	гипотетический белок
GCW_00545	1,33	ABC-транспортёр
GCW_00550	1,34	ABC-транспортёр системы множественной лекарственной устойчивости
GCW_00555	1,12	белок с ароматическим кластером
GCW_00565	1,25	белок с ароматическим кластером

GCW_00570	1,94	гипотетический белок
GCW_00575	3,65	гипотетический белок
GCW_00580	1,00	транспозаза
GCW_00585	2,41	сериновая протеаза
GCW_00590	2,24	мембранный белок
GCW_00595	1,28	сериновая протеаза
GCW_00600	1,58	мембранный белок
GCW_00605	-1,05	фактор элонгации транскрипции NusA
GCW_00610	-1,49	гипотетический белок
GCW_00615	-1,29	фактор инициации трансляции IF-2
GCW_00620	-1,11	фактор связывания рибосом A
GCW_00650	-1,02	гипотетический белок
GCW_00660	1,33	Бифункциональный белок FAD-синтаза и tPHK метилтрансфераза
GCW_00670	-1,24	аланил-tPHK синтетаза
GCW_00675	-1,14	резольваза
GCW_00705	-2,39	метионил-tPHK формилтрансфераза
GCW_00710	-1,50	гипотетический белок
GCW_00715	-1,73	бета-галактозидаза
GCW_00720	-1,03	гипотетический белок
GCW_00725	-1,23	транскрипционный фактор
GCW_00760	-2,27	гипотетический белок
GCW_00765	-1,73	транспортёр PTS-системы
GCW_00775	1,39	50S рибосомальный белок L31
GCW_00780	1,34	фактор терминации трансляции RF-1
GCW_00810	-1,26	гистоноподобный белок HU
GCW_00860	1,64	метионил-tPHK синтетаза
GCW_00865	2,12	шаперон DnaJ
GCW_00875	-1,09	гипотетический белок
GCW_00890	-1,32	ГТФ-связывающий белок, гомолог RAS
GCW_00895	-1,15	цитидилат-киназа
GCW_00965	1,26	мембранный белок
GCW_00975	2,33	мембранный белок
GCW_01060	1,62	цитадгезин C
GCW_01070	-1,29	аспарил-tPHK синтетаза
GCW_01080	-1,28	СТР синтаза
GCW_01140	2,57	ДНК-связывающий ферритиноподобный белок
GCW_01145	-3,18	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01150	-1,13	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01155	-2,09	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01175	-1,68	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01195	-1,57	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01210	2,32	дезоксидефосфат 5'-трифосфат нуклеотидогидролаза
GCW_01215	-1,12	протеаза
GCW_01220	-1,77	псевдоуридин синтаза
GCW_01225	-2,22	пептидаза A8
GCW_01255	1,16	гипотетический белок
GCW_01260	1,07	гипотетический белок
GCW_01270	2,84	высокоаффинный ABC транспортёр HatA
GCW_01275	3,20	высокоаффинный ABC транспортёр HatB
GCW_01290	2,89	гипотетический белок
GCW_01295	3,53	гипотетический белок
GCW_01300	4,68	гипотетический белок
GCW_01305	2,13	переносчик жирных кислот
GCW_01330	1,38	гипотетический белок
GCW_01350	-1,20	мембранный белок
GCW_01385	1,02	гипотетический белок
GCW_01410	1,09	2-C-метил-D-эритритол-4-фосфат цитидилтрансфераза

GCW_01430	1,27	ABC транспортёр, АТФаза
GCW_01435	1,75	ABC транспортёр, пермеаза
GCW_01440	1,72	ABC транспортёр, пермеаза
GCW_01445	1,99	гипотетический белок
GCW_01450	1,24	гипотетический белок
GCW_01495	1,00	сигнальная пептидаза I
GCW_01500	2,23	фактор элонгации трансляции EF-G
GCW_01505	2,64	гипотетический белок
GCW_01525	1,71	бифункциональный белок PTS система, SAM-метилтрансфераза
GCW_01530	2,16	транспозаза
GCW_01535	1,34	флаводоксин
GCW_01540	1,19	гипотетический белок
GCW_01555	-1,28	гидролаза HAD
GCW_01580	-2,19	металл-зависимая гидролаза
GCW_01585	-1,19	ABC транспортёр, АТФаза
GCW_01640	-1,10	белок SRP системы
GCW_01670	1,62	гипотетический белок
GCW_01675	2,10	гипотетический белок
GCW_01685	-1,66	50S рибосомальный белок L13
GCW_01690	-1,59	30S рибосомальный белок S9
GCW_01695	-3,56	4-гидрокси-3-метилбут-2-ен-1-ил дифосфатесинтаза
GCW_01700	-2,79	урацил фосфорибозилтрансфераза
GCW_01790	-1,24	пермеаза аминокислот
GCW_01800	1,08	30S рибосомальный белок S21
GCW_01815	-1,86	тРНК (гуанидин-N(7))-метилтрансфераза
GCW_01820	-1,74	рРНК метилтрансфераза
GCW_01850	1,10	гипотетический белок
GCW_01865	-1,44	гипотетический белок
GCW_01890	1,38	АТФ-синтетаза, субъединица В
GCW_01895	2,44	эстераза
GCW_01900	1,10	шаперон DnaJ
GCW_01940	-3,02	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01960	-2,61	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01965	2,52	гипотетический белок
GCW_01975	3,39	бета-фосфоглюкомутаза
GCW_01985	1,43	мальтозофосфорилаза
GCW_01990	1,37	гипотетический белок
GCW_01995	1,51	гипотетический белок
GCW_02000	-1,89	1-дезоксид-Д-ксилоулозо-5-фосфат синтаза
GCW_02005	-2,58	репрессор белков теплового шока HrcA
GCW_02015	-1,34	пролиновая дипептидаза
GCW_02055	1,14	гипотетический белок
GCW_02095	1,45	гипотетический белок
GCW_02105	2,24	протеаза Lon
GCW_02130	1,74	ацетил-KoA гидролаза
GCW_02170	1,77	белок фиксации азота
GCW_02175	1,57	глицерол-3-фосфат ацилтрансфераза
GCW_02180	1,65	фактор связывания NGG1p 3
GCW_02220	2,50	гипотетический белок
GCW_02230	1,33	гипотетический белок
GCW_02235	1,92	белок клеточного деления FtsZ
GCW_02240	3,89	белок клеточного деления FtsA
GCW_02245	2,96	16S рРНК метилтрансфераза
GCW_02250	2,53	белок клеточного деления MraZ
GCW_02300	2,32	АТФаза AAA-типа
GCW_02335	-1,52	гистоноподобный белок HU
GCW_02340	-1,45	гипотетический белок

GCW_02360	1,08	Система рестрикции-модификации, субъединица S
GCW_02365	1,52	Система рестрикции-модификации, субъединица R
GCW_02370	2,71	гипотетический белок
GCW_02375	-3,18	гипотетический белок
GCW_02380	-1,98	гипотетический белок
GCW_02390	-2,60	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02405	-1,35	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02410	-1,72	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02440	-1,46	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02455	-2,60	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02480	-1,90	калиевый транспортёр
GCW_02485	-2,01	лейцил-тРНК синтетаза
GCW_02500	-1,45	2,5-дикето-D-глюконат редуктаза
GCW_02505	1,29	гипотетический белок
GCW_02510	1,96	гипотетический белок
GCW_02560	1,67	аргинин-деиминаза
GCW_02565	-1,46	уридин-киназа
GCW_02570	-1,10	гипотетический белок
GCW_02580	-1,79	гипотетический белок
GCW_02585	-1,45	гипотетический белок
GCW_02600	2,50	гипотетический белок
GCW_02700	1,05	транспозаза
GCW_02710	-1,63	шаперон GroEL
GCW_02715	-2,00	шаперон GroES
GCW_02720	-1,35	пируват-киназа
GCW_02725	-1,51	6-фосфофруктокиназа
GCW_02730	-1,83	липоат-протеин киназа
GCW_02735	-1,31	дигидролипоил дегидрогеназа
GCW_02740	-1,28	пируват-дегидрогеназа субъединица E2
GCW_02765	2,29	транспортёр катионов
GCW_02770	2,26	белок с CBS доменом
GCW_02775	-2,23	дезоксигуанозин киназа
GCW_02780	-1,96	дезоксигуанозин киназа
GCW_02785	3,79	шаперон ClpB
GCW_02795	-1,00	глицерол-3-фосфат ацилтрансфераза
GCW_02800	-1,22	дигидроксиацетон киназа и белок YloV
GCW_02810	-1,18	псевдоуридин синтаза
GCW_02815	-1,35	рРНК метилтрансфераза
GCW_02820	-1,29	гомолог экзополифосфатазы
GCW_02855	-2,16	РНК-хеликаза
GCW_02865	1,22	мембранный белок
GCW_02870	-2,06	нуклеотид-связывающий белок с гистидиновой триадой
GCW_02895	1,79	гипотетический белок
GCW_02915	-1,41	ABC-транспортёр пептидов, АТФаза
GCW_02920	-1,53	ABC-транспортёр пептидов, пермеаза
GCW_02925	-1,76	ABC-транспортёр пептидов, пермеаза
GCW_02930	-2,62	гипотетический белок
GCW_02935	1,78	гипотетический белок
GCW_02975	1,30	30S рибосомальный белок S2
GCW_02980	-1,37	азоредуктаза
GCW_02985	1,22	гомолог промнина
GCW_03010	1,06	50S рибосомальный белок L28
GCW_03015	-2,30	гипотетический белок
GCW_03070	2,76	гипотетический белок
GCW_03075	1,71	шаперон DnaK
GCW_03080	-1,38	гипотетический белок
GCW_03085	2,04	ионный канал

GCW_03090	1,70	механочувствительный канал высокой проводимости
GCW_03095	2,25	пермеаза аминокислот
GCW_03100	1,82	компонент PTS системы IIA
GCW_03105	1,53	полифосфат/АТФ-НАД киназа
GCW_03125	1,49	дегалогеназа галоокислот
GCW_03130	1,14	гипотетический белок
GCW_03140	1,38	компонент PTS системы
GCW_03185	2,15	сиалидаза
GCW_03215	3,29	гипотетический белок
GCW_03240	-2,24	гликозил-трансфераза
GCW_03245	-1,15	ДНК-полимераза IV
GCW_03310	-1,55	дезоксирибозо-фосфат фосфорилаза
GCW_03315	-1,34	пурин-нуклеозид фосфорилаза
GCW_03320	-1,29	АВС-транспортёр сахаров, пермеаза
GCW_03325	-2,21	АВС-транспортёр сахаров, пермеаза
GCW_03330	-2,31	АВС-транспортёр сахаров, АТФаза
GCW_03335	-1,56	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03345	-1,16	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03350	-3,02	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03360	-1,44	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03370	-1,81	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03385	1,17	рекомбиназа RecR
GCW_03405	2,17	Хеликаза структур Холидея RuvB
GCW_03410	1,65	Хеликаза структур Холидея RuvA
GCW_03415	1,02	гипотетический белок
GCW_03435	2,06	урацил-тРНК гликозилаза
GCW_03440	1,54	гипотетический белок
GCW_03445	1,33	ДНК-хеликаза
GCW_03455	1,05	30S рибосомальный белок S18
GCW_03475	-1,34	никотинат фосфорибозил-трансфераза
GCW_03500	1,81	ГТФаза
GCW_03505	1,36	гипотетический белок
GCW_03540	1,07	30S рибосомальный белок S13
GCW_03570	-1,60	рибулозо-фосфат 3-эпимераза
GCW_03575	-2,00	глюкозо-6-фосфат изомераза
GCW_03580	-1,27	ГТФаза биогенеза рибосом RsgA
GCW_03585	-1,63	серин/треонин протеин-киназа
GCW_03590	-1,47	серин/треонин протеин-фосфатаза
GCW_03595	-1,60	гуанилат киназа
GCW_03605	-1,20	транспортёр MFS
GCW_03615	1,24	16S рРНК метилтрансфераза
GCW_03620	1,60	гипотетический белок
GCW_03625	1,33	гипотетический белок
GCW_03655	-1,68	гипотетический белок
GCW_03660	-1,77	гипотетический белок
GCW_03665	-1,60	гипотетический белок
GCW_03670	-1,77	гипотетический белок
GCW_03675	-1,72	F0F1 АТФ-синтетаза, субъединица α
GCW_03680	-1,86	F0F1 АТФ-синтетаза, субъединица β
GCW_03685	-1,28	гипотетический белок
GCW_03690	-1,45	гипотетический белок
GCW_03695	-2,09	РНК-полимераза, δ -субъединица
GCW_03700	-2,00	фруктозо-бисфосфат альдолаза
GCW_03705	-1,46	ГТФ-связывающий белок YchF
GCW_03715	1,57	50S рибосомальный белок L11
GCW_03720	1,70	50S рибосомальный белок L1
GCW_03725	1,27	пептидил-тРНК гидролаза

GCW_03730	2,00	tPHK(Ile)-лизидин синтетаза
GCW_03735	1,12	компонент PTS системы IIABC
GCW_03740	1,18	гипотетический белок
GCW_03745	1,46	маннозо-6-фосфат изомераза
GCW_03750	2,80	гипотетический белок
GCW_03765	-1,90	CRISPR-ассоциированный белок Cas1
GCW_03770	-1,91	CRISPR-ассоциированный белок Cas2
GCW_03775	-1,22	гипотетический белок
GCW_03780	-2,06	pPHK метилтрансфераза
GCW_03785	-1,76	цистеинил-tPHK синтетаза
GCW_03790	1,73	гипотетический белок
GCW_03795	1,23	гипотетический белок
GCW_03800	1,16	пептидаза S8
GCW_03805	2,38	АТФ-аза семейства AAA
GCW_03815	2,77	Белок системы рестрикции-модификации, субъединица S
GCW_03820	2,92	Белок системы рестрикции-модификации, субъединица S
GCW_03825	1,57	DEAD/DEAH хеликаза
GCW_03835	1,66	гипотетический белок
GCW_03840	1,40	гипотетический белок
GCW_03845	1,70	гипотетический белок
GCW_03875	1,76	гипотетический белок
GCW_03880	1,96	альдегид дегидрогеназа
GCW_03890	1,49	F0F1 АТФ-синтетаза, субъединица β
GCW_03895	1,52	гипотетический белок
GCW_03900	1,85	пептидаза
GCW_03930	-2,11	метионин-сульфоксид редуктаза A
GCW_03945	1,67	белок PARP
GCW_03960	3,27	гипотетический белок
GCW_03965	2,46	пептидаза
GCW_03970	3,03	гипотетический белок
GCW_03980	1,10	гипотетический белок
GCW_03995	7,25	гипотетический белок
GCW_04020	-1,08	диацилглицерил трансфераза
GCW_04025	-1,09	HPg-киназа
GCW_04045	1,23	ГТФаза модификации tPHK TrmE
GCW_04050	1,14	ДНК-полимераза, δ' -субъединица
GCW_04075	1,36	шаперон DnaJ
GCW_04080	1,41	ДНК-полимераза, β -субъединица
GCW_90014	1,89	АТФаза
GCW_90015	3,35	система экспорта липида A, АТФаза/пермеаза
GCW_90016	2,84	АВС-транспортёр антимикробных пептидов, АТФаза
GCW_90017	2,55	АВС-транспортёр кобальта, АТФаза
GCW_90068	-1,04	глицерол киназа
GCW_90093	-1,08	ГМФ-синтаза
GCW_90103	1,18	транспозаза
GCW_90292	-1,52	рибосомальный белок L23p (L23Ae)
GCW_90422	-2,12	транспортёр цинка
GCW_90442	-1,11	гипотетический белок
GCW_90501	1,58	ДНК-полимераза, α -субъединица
GCW_90502	1,08	ДНК-полимераза, α -субъединица
GCW_90524	2,67	гипотетический белок
GCW_90526	2,80	гипотетический белок
GCW_90537	1,30	транспозаза
GCW_90538	1,52	транспозаза
GCW_90632	1,17	транспозаза
GCW_90642	1,31	гипотетический белок

GCW_90644	1,15	транспозаза
GCW_90646	1,32	транспозаза
GCW_90867	1,02	шаперон DnaJ
GCW_90876	1,67	
GCW_90877	1,25	
GCW_91181	-2,62	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_91276	2,69	высокоаффинный ABC транспортёр HatC
GCW_91423	1,15	липопротеин LppH
GCW_91455	-1,35	транспозаза
GCW_91508	1,18	транспозаза
GCW_91652	1,25	транспозаза
GCW_91852	1,15	гипотетический белок
GCW_91909	2,78	гипотетический белок
GCW_91912	1,26	гипотетический белок
GCW_91946	-1,81	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_91947	-2,44	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_91988	1,46	Мальтозо/трегалозо фосфорилаза
GCW_92036	-2,03	фенилаланил-тРНК синтетаза, α -субъединица
GCW_92037	-1,63	фенилаланил-тРНК синтетаза, β -субъединица
GCW_92038	3,84	
GCW_92039	3,70	гипотетический белок
GCW_92148	1,08	Хеликаза UvrD
GCW_92149	1,30	Хеликаза UvrD
GCW_92263	-1,80	Белок сегрегации хромосом ScpB
GCW_92264	-2,03	Дигидрофолат редуктаза и белок сегрегации хромосом ScpA/B
GCW_92301	2,87	гипотетический белок
GCW_92302	2,09	гипотетический белок
GCW_92417	1,39	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92433	1,24	транспозаза
GCW_92452	-1,47	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92453	-2,27	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92457	-1,64	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92548	1,24	транспозаза
GCW_92579	-1,13	Ras-подобная ГТФаза
GCW_92996	1,02	гипотетический белок
GCW_93046	1,28	гипотетический белок
GCW_93187	1,77	глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
GCW_93352	-2,42	гипотетический белок
GCW_93362	-2,03	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_93396	4,01	гипотетический белок
GCW_93654	-2,75	гипотетический белок
GCW_93751	3,02	Сериновая протеаза семейства субтилизина
GCW_93752	2,96	белок AprE семейства
GCW_93776	-1,68	гипотетический белок
GCW_93807	1,55	Бифункциональный белок, N-6 аденин-специфичная ДНК-метилаза и ДНК-полимераза
GCW_93874	1,95	23S рРНК (гуанозин-2'-О) метилтрансфераза
GCW_93876	1,31	альдегид дегидрогеназа
GCW_93902	2,26	гипотетический белок
GCW_93946	4,28	гипотетический белок
GCW_93948	4,66	гипотетический белок
GCW_93958	3,47	гипотетический белок
GCW_93971	2,17	Бифункциональный белок RecA-НТФаза, АТФ-синтетаза α/β
GCW_94036	1,43	
GCW_99016	5,46	ABC-транспортёр, АТФаза/пермеаза
GCW_99017	1,34	гипотетический белок
GCW_99018	2,22	ABC-транспортёр, АТФаза/пермеаза

Таблица 2. Открытые рамки считывания, значимо меняющие уровень транскрипции (двоичный логарифм относительного нормализованного покрытия) в тепловом стрессе 15 минут, (q -value<0,05).

Локус	Изм.	Функция
GCW_00015	5,68	гипотетический белок
GCW_00030	-2,10	50S рибосомальный белок L34
GCW_00035	-1,69	рибонуклеаза Р
GCW_00040	-1,34	белок системы транслокации белков YidC
GCW_00075	-2,02	глицерол-3-фосфат дегидрогеназа
GCW_00080	-1,06	гипотетический белок
GCW_00085	1,46	ферритин
GCW_00095	-2,30	рибонуклеаза J
GCW_00110	1,01	ABC-транспортёр, пермеаза
GCW_00125	1,77	гипотетический белок
GCW_00155	-2,34	белок PTS системы HPr
GCW_00170	-2,60	липопротеин
GCW_00175	-3,42	нуклеаза
GCW_00180	-2,78	ABC-транспортёр sn-глицерол-3-фосфата, АТФаза
GCW_00185	-2,33	ABC-транспортёр, пермеаза
GCW_00190	-2,08	ABC-транспортёр, пермеаза
GCW_00195	-2,30	гипотетический белок
GCW_00200	-1,89	гипотетический белок
GCW_00205	-2,23	нуклеаза системы эксцизионной репарации uvrB
GCW_00210	-2,03	ABC-транспортёр фосфата, субстрат-связывающая субъединица
GCW_00215	-2,37	ABC-транспортёр фосфата, пермеаза
GCW_00220	-2,20	ABC-транспортёр фосфата, АТФаза
GCW_00225	-2,26	ABC-транспортёр фосфата
GCW_00235	-1,54	рибонуклеотид-редуктаза
GCW_00240	-2,16	рибонуклеозид-редуктаза
GCW_00245	-1,26	тимидилат-синтаза
GCW_00260	2,15	гипотетический белок
GCW_00265	1,03	гипотетический белок
GCW_00275	-3,40	30S рибосомальный белок S10
GCW_00280	-2,44	50S рибосомальный белок L3
GCW_00285	-2,21	50S рибосомальный белок L4
GCW_00290	-2,35	50S рибосомальный белок L23
GCW_00295	-1,88	50S рибосомальный белок L2
GCW_00300	-2,07	30S рибосомальный белок S19
GCW_00305	-2,08	50S рибосомальный белок L22
GCW_00310	-1,81	30S рибосомальный белок S3
GCW_00315	-1,60	50S рибосомальный белок L16
GCW_00320	-2,06	50S рибосомальный белок L29
GCW_00325	-1,75	30S рибосомальный белок S17
GCW_00330	-1,54	50S рибосомальный белок L14
GCW_00335	-1,86	50S рибосомальный белок L24
GCW_00340	-1,60	50S рибосомальный белок L5
GCW_00345	-1,60	30S рибосомальный белок S14
GCW_00350	-1,41	30S рибосомальный белок S8
GCW_00355	-1,37	50S рибосомальный белок L6
GCW_00360	-1,18	50S рибосомальный белок L18
GCW_00365	-1,23	30S рибосомальный белок S5
GCW_00405	1,67	гипотетический белок
GCW_00410	-3,49	лизил-тРНК синтаза
GCW_00415	-2,25	шаперон DnaJ
GCW_00445	1,75	30S рибосомальный белок S15

GCW_00465	1,94	гипотетический белок, PolC домен
GCW_00470	1,30	нуклеаза системы эксцизионной репарации <i>uvrA</i>
GCW_00510	1,29	транспортёр тяжёлых металлов <i>CzcA</i>
GCW_00515	2,77	гипотетический протеин
GCW_00520	1,42	мембранный белок
GCW_00535	3,10	гипотетический белок
GCW_00550	1,11	ABC-транспортёр системы множественной лекарственной устойчивости
GCW_00570	1,61	гипотетический белок
GCW_00575	3,88	гипотетический белок
GCW_00585	2,41	сериновая протеаза
GCW_00590	2,23	мембранный белок
GCW_00595	1,31	сериновая протеаза
GCW_00600	1,63	мембранный белок
GCW_00650	-1,34	гипотетический белок
GCW_00660	1,64	Бифункциональный белок FAD-синтаза и тРНК метилтрансфераза
GCW_00670	-1,62	аланил-тРНК синтетаза
GCW_00675	-1,84	резольваза
GCW_00685	-1,26	пептидаза U32
GCW_00690	-1,36	пептидаза U32
GCW_00700	-1,24	примембранная внутриклеточная пептидаза
GCW_00705	-2,16	метионил-тРНК формилтрансфераза
GCW_00710	-1,47	гипотетический белок
GCW_00715	-2,74	бета-галактозидаза
GCW_00720	-1,35	гипотетический белок
GCW_00725	-1,91	транскрипционный фактор
GCW_00760	-2,67	гипотетический белок
GCW_00765	-1,87	транспортёр PTS-системы
GCW_00780	1,11	фактор терминации трансляции RF-1
GCW_00805	1,12	резольваза
GCW_00810	-1,55	гистоноподобный белок HU
GCW_00825	-1,09	50S рибосомальный белок L10
GCW_00835	-1,12	50S рибосомальный белок L32
GCW_00840	-1,01	гипотетический белок
GCW_00860	1,69	метионил-тРНК синтетаза
GCW_00865	1,98	шаперон DnaJ
GCW_00875	-1,20	гипотетический белок
GCW_00965	1,04	мембранный белок
GCW_00975	1,74	мембранный белок
GCW_00980	-1,14	гипотетический белок
GCW_01010	-1,40	триггер-фактор
GCW_01015	-1,07	гипотетический белок
GCW_01040	-1,47	цитадгезин P32
GCW_01060	1,35	цитадгезин C
GCW_01065	-1,08	гистидил-тРНК синтетаза
GCW_01070	-1,11	аспарил-тРНК синтетаза
GCW_01080	-1,15	СТР синтаза
GCW_01085	-1,66	гипотетический белок
GCW_01090	-1,35	аденин фосфорибозилтрансфераза
GCW_01095	-1,90	гипотетический белок
GCW_01100	-1,10	гипотетический белок
GCW_01140	2,32	ДНК-связывающий ферритиноподобный белок
GCW_01145	-3,22	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01155	-2,19	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01165	2,21	гипотетический белок
GCW_01175	-1,73	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01180	2,22	гипотетический белок
GCW_01190	2,28	гипотетический белок

GCW_01195	-1,45	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01210	2,12	дезоксидин 5'-трифосфат нуклеотидогидролаза
GCW_01215	-1,32	протеаза
GCW_01220	-1,54	псевдоуридин синтаза
GCW_01225	-2,41	пептидаза A8
GCW_01255	1,44	гипотетический белок
GCW_01260	1,17	гипотетический белок
GCW_01290	2,31	гипотетический белок
GCW_01295	3,08	гипотетический белок
GCW_01300	4,36	гипотетический белок
GCW_01305	1,79	переносчик жирных кислот
GCW_01315	-1,11	фактор элонгации трансляции EF-Tu
GCW_01330	1,60	гипотетический белок
GCW_01350	-1,31	мембранный белок
GCW_01385	1,43	гипотетический белок
GCW_01405	1,21	гипотетический белок
GCW_01410	1,40	2-С-метил-D-эритритол-4-фосфат цитидилтрансфераза
GCW_01430	1,72	ABC транспортёр, АТФаза
GCW_01435	2,14	ABC транспортёр, пермеаза
GCW_01440	2,37	ABC транспортёр, пермеаза
GCW_01445	2,57	гипотетический белок
GCW_01450	1,20	гипотетический белок
GCW_01495	1,05	сигнальная пептидаза I
GCW_01500	2,14	фактор элонгации трансляции EF-G
GCW_01505	2,74	гипотетический белок
GCW_01525	1,85	бифункциональный белок PTS система, SAM-метилтрансфераза
GCW_01530	2,63	транспозаза
GCW_01555	-1,17	гидролаза HAD
GCW_01580	-1,90	металл-зависимая гидролаза
GCW_01585	-1,37	ABC транспортёр, АТФаза
GCW_01635	-1,31	пероксиредоксин
GCW_01670	1,16	гипотетический белок
GCW_01675	2,27	гипотетический белок
GCW_01685	-2,13	50S рибосомальный белок L13
GCW_01690	-1,89	30S рибосомальный белок S9
GCW_01695	-3,37	4-гидрокси-3-метилбут-2-ен-1-ил дифосфатсинтаза
GCW_01700	-2,67	урацил фосфорибозилтрансфераза
GCW_01710	-1,75	АТФ-синтаза F0F1, субъединица I
GCW_01715	-1,32	АТФ-синтаза F0F1, субъединица A
GCW_01780	-1,48	глицерол-3-фосфат дегидрогеназа
GCW_01785	-1,44	фосфоглицерат киназа
GCW_01810	-1,56	гипотетический белок
GCW_01815	-1,44	тРНК (гуанидин-N(7))-метилтрансфераза
GCW_01820	-1,94	рРНК метилтрансфераза
GCW_01825	-1,46	изолейцил-тРНК синтаза
GCW_01830	-1,33	флаводоксин
GCW_01850	1,10	гипотетический белок
GCW_01860	-1,25	гипотетический белок
GCW_01865	-1,41	гипотетический белок
GCW_01885	1,71	белок сегрегации хромосом Smc
GCW_01890	1,58	АТФ-синтаза, субъединица B
GCW_01895	2,88	эстераза
GCW_01900	1,17	шаперон DnaJ
GCW_01910	1,27	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01925	2,19	гипотетический белок
GCW_01930	-1,09	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01935	1,86	гипотетический белок

GCW_01940	-3,79	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01960	-2,85	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01965	2,88	гипотетический белок
GCW_01975	3,14	бета-фосфоглюкомутаза
GCW_01985	1,54	мальтозофосфорилаза
GCW_01995	1,11	гипотетический белок
GCW_02000	-1,55	1-дезоксид-Д-ксилоулозо-5-фосфат синтаза
GCW_02005	-1,95	репрессор белков теплового шока HrcA
GCW_02015	-1,07	пролиновая дипептидаза
GCW_02020	-1,15	фактор инициации трансляции IF-3
GCW_02025	-1,11	50S рибосомальный белок L35
GCW_02055	1,97	гипотетический белок
GCW_02095	1,51	гипотетический белок
GCW_02105	1,73	протеаза Lon
GCW_02110	1,08	ABC транспортёр, пермеаза
GCW_02115	1,32	ABC транспортёр, АТФаза
GCW_02125	2,21	КоА трансфераза
GCW_02130	2,85	ацетил-КоА гидролаза
GCW_02140	1,01	5-формилтетрагидрофолат циклолигаза
GCW_02170	1,90	белок фиксации азота
GCW_02175	1,86	глицерол-3-фосфат ацилтрансфераза
GCW_02180	1,69	фактор связывания NGG1p 3
GCW_02220	2,60	гипотетический белок
GCW_02230	1,51	гипотетический белок
GCW_02235	1,76	белок клеточного деления FtsZ
GCW_02240	3,76	белок клеточного деления FtsA
GCW_02245	2,70	16S рРНК метилтрансфераза
GCW_02250	1,99	белок клеточного деления MraZ
GCW_02300	2,33	АТФаза AAA-типа
GCW_02330	-1,58	ДНК-топоизомераза IV, β -субъединица
GCW_02335	-2,06	гистоноподобный белок HU
GCW_02340	-2,10	гипотетический белок
GCW_02370	2,08	гипотетический белок
GCW_02375	-3,26	гипотетический белок
GCW_02380	-2,30	гипотетический белок
GCW_02390	-2,86	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02395	2,16	гипотетический белок
GCW_02405	-1,13	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02410	-1,47	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02415	2,25	гипотетический белок
GCW_02425	1,57	гипотетический белок
GCW_02430	-1,25	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02440	-1,23	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02455	-2,91	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02480	-2,06	калиевый транспортёр
GCW_02485	-1,64	лейцил-тРНК синтаза
GCW_02495	-1,03	фосфолипид-связывающий белок
GCW_02500	-1,12	2,5-дикето-Д-глюконат редуктаза
GCW_02510	1,91	гипотетический белок
GCW_02560	1,99	аргинин-деиминаза
GCW_02585	-1,83	гипотетический белок
GCW_02590	-1,29	пептидаза M17
GCW_02600	3,96	гипотетический белок
GCW_02605	1,19	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_02610	1,01	гипотетический белок
GCW_02625	-1,29	рибонуклеаза R
GCW_02630	-1,55	белок системы транслокации белков SecE

GCW_02640	-1,43	тиоредоксин редуктаза
GCW_02645	-1,52	транскрипционный регулятор семейства GntR
GCW_02710	-1,71	шаперон GroEL
GCW_02715	-1,90	шаперон GroES
GCW_02720	-1,34	пируват-киназа
GCW_02725	-1,38	6-фосфофруктокиназа
GCW_02730	-1,41	липоат-протеин киназа
GCW_02735	-1,30	дигидролипоил дегидрогеназа
GCW_02740	-1,41	пируват-дегидрогеназа субъединица E2
GCW_02745	-1,28	пируват-дегидрогеназа субъединица E1 β
GCW_02750	-1,46	пируват-дегидрогеназа субъединица E1 α
GCW_02755	-1,49	НАДН оксидаза
GCW_02765	1,85	транспортёр катионов
GCW_02770	1,50	белок с CBS доменом
GCW_02775	-1,78	дезоксигуанозин киназа
GCW_02780	-1,32	дезоксигуанозин киназа
GCW_02785	2,30	шаперон ClpB
GCW_02800	-1,25	дигидроксиацетон киназа и белок YloV
GCW_02805	-1,80	гипотетический белок
GCW_02855	-1,27	РНК-хеликаза
GCW_02865	1,58	мембранный белок
GCW_02870	-2,15	нуклеотид-связывающий белок с гистидиновой триадой
GCW_02910	-1,02	ABC-транспортёр пептидов, АТФаза
GCW_02915	-1,60	ABC-транспортёр пептидов, АТФаза
GCW_02920	-1,95	ABC-транспортёр пептидов, пермеаза
GCW_02925	-2,31	ABC-транспортёр пептидов, пермеаза
GCW_02930	-2,61	гипотетический белок
GCW_02935	1,55	гипотетический белок
GCW_02960	-1,20	ABC-транспортёр пептидов, субстрат-связывающая субъединица
GCW_02965	-1,75	гипотетический белок
GCW_02975	1,04	30S рибосомальный белок S2
GCW_02980	-1,98	азоредуктаза
GCW_02985	1,45	гомолог промнина
GCW_02990	1,24	рекомбиназа RarA
GCW_03015	-2,56	гипотетический белок
GCW_03070	3,10	гипотетический белок
GCW_03075	1,05	шаперон DnaK
GCW_03080	-1,63	гипотетический белок
GCW_03085	2,22	ионный канал
GCW_03090	1,46	механочувствительный канал высокой проводимости
GCW_03095	2,46	пермеаза аминокислот
GCW_03100	1,62	компонент PTS системы IIA
GCW_03105	1,40	полифосфат/АТФ-НАД киназа
GCW_03125	1,55	дегалогеназа галоокислот
GCW_03140	1,59	компонент PTS системы
GCW_03185	2,66	сиалидаза
GCW_03215	2,92	гипотетический белок
GCW_03230	-1,32	гипотетический белок
GCW_03240	-2,14	гликозил-трансфераза
GCW_03295	-1,22	фосфоманномутаза
GCW_03300	-1,22	цитидин дезаминаза
GCW_03305	-1,83	тимидин фосфорилаза
GCW_03310	-2,74	дезоксирибозо-фосфат фосфорилаза
GCW_03315	-2,72	пурин-нуклеозид фосфорилаза
GCW_03320	-2,80	ABC-транспортёр сахаров, пермеаза
GCW_03325	-3,37	ABC-транспортёр сахаров, пермеаза
GCW_03330	-3,63	ABC-транспортёр сахаров, АТФаза

GCW_03335	-1,54	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03345	-1,41	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03350	-3,65	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03360	-1,81	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03370	-1,88	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_03385	1,52	рекомбиназа RecR
GCW_03405	2,81	Хеликаза структур Холидея RuvB
GCW_03410	2,20	Хеликаза структур Холидея RuvA
GCW_03415	1,59	гипотетический белок
GCW_03430	1,02	аспартил/глутамил-тРНК амидотрансфераза, субъединица C
GCW_03435	2,19	урацил-тРНК гликозилаза
GCW_03440	1,48	гипотетический белок
GCW_03445	1,15	ДНК-хеликаза
GCW_03475	-1,14	никотинат фосфорибозил-трансфераза
GCW_03490	1,05	гидролаза семейства HAD
GCW_03500	2,59	ГТФаза
GCW_03505	1,83	гипотетический белок
GCW_03570	-1,79	рибулозо-фосфат 3-эпимераза
GCW_03575	-2,16	глюкозо-6-фосфат изомераза
GCW_03585	-1,39	серин/треонин протеин-киназа
GCW_03590	-1,73	серин/треонин протеин-фосфатаза
GCW_03595	-1,96	гуанилат киназа
GCW_03605	-1,34	транспортёр MFS
GCW_03620	1,32	гипотетический белок
GCW_03625	2,28	гипотетический белок
GCW_03695	-2,77	РНК-полимераза, δ -субъединица
GCW_03700	-2,82	фруктозо-бисфосфат альдолаза
GCW_03705	-2,07	ГТФ-связывающий белок YchF
GCW_03710	-1,60	тимидин киназа
GCW_03725	1,04	пептидил-тРНК гидролаза
GCW_03730	2,32	тРНК(Ile)-лизидин синтетаза
GCW_03735	2,08	компонент PTS системы IIABC
GCW_03740	2,29	гипотетический белок
GCW_03745	2,63	маннозо-6-фосфат изомераза
GCW_03750	2,90	гипотетический белок
GCW_03765	-1,97	CRISPR-ассоциированный белок Cas1
GCW_03770	-1,81	CRISPR-ассоциированный белок Cas2
GCW_03775	-1,09	гипотетический белок
GCW_03780	-1,59	рРНК метилтрансфераза
GCW_03785	-1,49	цистеинил-тРНК синтетаза
GCW_03790	2,33	гипотетический белок
GCW_03795	1,78	гипотетический белок
GCW_03800	1,87	пептидаза S8
GCW_03805	2,59	АТФ-аза семейства AAA
GCW_03815	3,52	Белок системы рестрикции-модификации, субъединица S
GCW_03820	3,62	Белок системы рестрикции-модификации, субъединица S
GCW_03825	2,19	DEAD/DEAH хеликаза
GCW_03835	1,80	гипотетический белок
GCW_03840	1,31	гипотетический белок
GCW_03845	1,76	гипотетический белок
GCW_03850	1,20	гипотетический белок
GCW_03875	2,08	гипотетический белок
GCW_03880	2,31	альдегид дегидрогеназа
GCW_03890	1,85	F0F1 АТФ-синтетаза, субъединица β
GCW_03895	2,10	гипотетический белок
GCW_03900	2,07	пептидаза
GCW_03915	-1,33	гипотетический белок

GCW_03920	-1,33	ДНК-лигаза
GCW_03930	-2,14	метионин-сульфоксид редуктаза A
GCW_03945	2,22	белок PARP
GCW_03960	3,45	гипотетический белок
GCW_03965	2,81	пептидаза
GCW_03970	3,38	гипотетический белок
GCW_03980	1,32	гипотетический белок
GCW_03995	8,70	гипотетический белок
GCW_04030	1,49	гипотетический белок
GCW_04035	-1,12	гипотетический белок
GCW_04045	2,69	ГТФаза модификации тРНК TgmE
GCW_04050	2,84	ДНК-полимераза, δ'-субъединица
GCW_04055	2,01	тимидилат киназа
GCW_04060	1,67	серил-тРНК синтетаза
GCW_04065	1,41	ДНК-гираза, α-субъединица
GCW_04070	1,70	ДНК-гираза, β-субъединица
GCW_04075	2,11	шаперон DnaJ
GCW_04080	1,81	ДНК-полимераза, β-субъединица
GCW_90014	1,41	АВС-транспортёр системы множественной лекарственной устойчивости, АТФаза
GCW_90015	3,94	система экспорта липида А, АТФаза/пермеаза
GCW_90017	3,01	АВС-транспортёр кобальта, АТФаза
GCW_90068	-1,43	глицерол киназа
GCW_90093	-2,11	ГМФ-синтаза
GCW_90094	-1,21	ГМФ-синтаза
GCW_90103	1,12	транспозаза
GCW_90292	-2,43	рибосомальный белок L23p (L23Ae)
GCW_90422	-2,36	транспортёр цинка
GCW_90442	-1,83	гипотетический белок
GCW_90501	2,51	ДНК-полимераза, α-субъединица
GCW_90502	1,77	ДНК-полимераза, α-субъединица
GCW_90524	3,45	гипотетический белок
GCW_90526	3,46	гипотетический белок
GCW_90537	1,25	транспозаза
GCW_90538	1,44	транспозаза
GCW_90632	1,02	транспозаза
GCW_90642	3,51	гипотетический белок
GCW_90646	1,34	транспозаза
GCW_90676	-1,20	SAM метилаза
GCW_90677	-1,13	O-метилтрансфераза
GCW_90876	1,96	белок экспорта токсинов
GCW_90877	1,47	белок экспорта токсинов
GCW_91176	-2,09	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_91181	-3,00	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_91278	-1,08	гипотетический белок
GCW_91421	1,07	гипотетический белок
GCW_91423	1,56	липопротеин LppH
GCW_91652	1,11	транспозаза
GCW_91852	1,02	гипотетический белок
GCW_91909	3,71	гипотетический белок
GCW_91912	2,30	гипотетический белок
GCW_91946	-2,11	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_91947	-2,44	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_91988	1,24	Мальтозо/трегалозо фосфорилаза
GCW_92036	-1,91	фенилаланил-тРНК синтетаза, α-субъединица
GCW_92037	-1,45	фенилаланил-тРНК синтетаза, β-субъединица
GCW_92038	3,98	белок PTS системы IIABC, маннитол-специфичный

GCW_92039	3,82	гипотетический белок
GCW_92148	1,27	Хеликаза UvrD
GCW_92149	1,24	Хеликаза UvrD
GCW_92263	-1,42	Белок сегрегации хромосом ScpB
GCW_92264	-1,03	Дигидрофолат редуктаза и белок сегрегации хромосом ScpA/B
GCW_92301	2,85	гипотетический белок
GCW_92302	2,01	гипотетический белок
GCW_92433	1,16	транспозаза
GCW_92452	-1,51	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92453	-2,65	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92454	-1,10	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92457	-1,65	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92548	1,16	транспозаза
GCW_92786	1,05	рибонуклеаза III
GCW_92861	4,42	гипотетический белок
GCW_92996	1,83	гипотетический белок
GCW_93046	1,61	гипотетический белок
GCW_93187	2,56	глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
GCW_93352	-2,81	гипотетический белок
GCW_93362	-1,81	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_93396	4,54	гипотетический белок
GCW_93654	-1,44	гипотетический белок
GCW_93751	3,17	Сериновая протеаза семейства субтилизина
GCW_93752	3,20	белок ArgE семейства
GCW_93852	-1,54	гипотетический белок
GCW_93874	3,07	23S рРНК (гуанозин-2'-О) метилтрансфераза
GCW_93876	1,60	альдегид дегидрогеназа
GCW_93902	2,41	гипотетический белок
GCW_93946	4,63	гипотетический белок
GCW_93948	5,01	гипотетический белок
GCW_93958	3,71	гипотетический белок
GCW_93971	2,52	бифункциональный белок RecA-НТФаза, АТФ-синтетаза α/β
GCW_94036	2,93	белок TatD семейства
GCW_99016	6,31	ABC-транспортёр, АТФаза/пермеаза
GCW_99017	2,05	гипотетический белок
GCW_99018	2,63	ABC-транспортёр, АТФаза/пермеаза

Таблица 3. Открытые рамки считывания, значимо меняющие уровень транскрипции (двоичный логарифм относительного нормализованного покрытия) в тепловом стрессе 30 минут, (q -value<0,05).

Локус	Изм.	Функция
GCW_00010	-1,99	белок инициации репликации DnaA
GCW_00265	1,05	гипотетический белок
GCW_00410	-1,09	лизил-тРНК синтетаза
GCW_00555	1,00	белок с ароматическим кластером
GCW_00570	1,23	гипотетический белок
GCW_00575	1,04	гипотетический белок
GCW_00770	1,21	глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
GCW_00820	-1,18	гипотетический белок
GCW_01035	-1,01	холин-киназа
GCW_01135	1,50	пермеаза аминокислот
GCW_01535	1,94	флаводоксин
GCW_01585	1,36	ABC транспортёр, АТФаза
GCW_01590	1,46	ABC транспортёр, АТФаза
GCW_01595	1,49	цистеин десульфуреза
GCW_01600	1,35	белок скаффолда системы сборки FeS кластеров

GCW_01605	1,57	белок скаффолда системы сборки FeS кластеров
GCW_01610	1,43	шаперон DnaJ
GCW_01635	1,48	пероксиредоксин
GCW_01640	-1,34	белок SRP системы
GCW_01670	1,32	гипотетический белок
GCW_01975	1,37	бета-фосфоглюкомутаза
GCW_02085	1,29	эндонуклеаза IV
GCW_02090	1,50	транскрипционный фактор Fur
GCW_02095	1,78	гипотетический белок
GCW_02120	2,24	ацетил-KoA гидролаза
GCW_02125	2,61	KoA трансфераза
GCW_02130	2,62	ацетил-KoA гидролаза
GCW_02220	1,13	гипотетический белок
GCW_02225	1,37	ABC-транспортёр бацитрацина
GCW_02230	1,29	гипотетический белок
GCW_02375	-1,10	гипотетический белок
GCW_02490	1,82	фосфолипид-связывающий белок
GCW_02495	1,64	фосфолипид-связывающий белок
GCW_02650	-1,11	гипотетический белок
GCW_02705	1,79	метионин-сульфоксид редуктаза B
GCW_02860	-1,04	енолаза
GCW_02980	1,32	азоредуктаза
GCW_03070	1,39	гипотетический белок
GCW_03240	-1,14	гликозил-трансфераза
GCW_03570	-1,38	рибулозо-фосфат 3-эпимераза
GCW_03575	-1,13	глюкозо-6-фосфат изомераза
GCW_03645	1,62	транспозаза
GCW_03655	-1,68	гипотетический белок
GCW_03660	-1,91	гипотетический белок
GCW_03665	-1,70	гипотетический белок
GCW_03670	-1,57	гипотетический белок
GCW_03675	-1,55	F0F1 АТФ-синтетаза, субъединица α
GCW_03680	-1,33	F0F1 АТФ-синтетаза, субъединица β
GCW_03685	-1,25	гипотетический белок
GCW_03740	-1,28	гипотетический белок
GCW_03750	-1,07	гипотетический белок
GCW_03760	-1,18	CRISPR-ассоциированный белок Csn1
GCW_03875	1,89	гипотетический белок
GCW_03880	1,41	альдегид дегидрогеназа
GCW_90068	-1,11	глицерол киназа
GCW_90601	1,19	гипотетический белок
GCW_90997	-1,52	белок сегрегации хромосом Smc
GCW_90999	-1,27	белок сегрегации хромосом Smc
GCW_91197	4,31	гипотетический белок
GCW_91912	1,47	гипотетический белок
GCW_92039	1,68	гипотетический белок
GCW_92117	2,15	Ацил дегидратаза
GCW_92263	-1,05	Белок сегрегации хромосом ScpB
GCW_93654	-1,45	гипотетический белок
GCW_93751	-1,13	Сериновая протеаза семейства субтилизина
GCW_93807	1,06	Бифункциональный белок, N-6 аденин-специфичная ДНК-метилаза и ДНК-полимераза
GCW_93876	1,42	альдегид дегидрогеназа

Таблица 4. Открытые рамки считывания, значительно меняющие уровень транскрипции (двоичный логарифм относительного нормализованного покрытия) в окислительном стрессе, (q -value<0,05).

Локус	Изм.	Функция
GCW_00005	-1,53	белок сегрегации хромосом ParA
GCW_00010	-1,89	белок инициации репликации DnaA
GCW_00065	-1,09	транспортёр глицерола
GCW_00125	1,91	гипотетический белок
GCW_00260	1,83	гипотетический белок
GCW_00450	1,24	рибонуклеаза J1/J2
GCW_00545	1,08	ABC-транспортёр
GCW_00575	1,31	гипотетический белок
GCW_00665	-1,09	ацетил-КоА гидролаза
GCW_00780	1,12	фактор терминации трансляции RF-1
GCW_00805	2,36	резольваза
GCW_00820	-1,11	гипотетический белок
GCW_00845	1,56	шаперон DnaJ
GCW_00865	1,43	шаперон DnaJ
GCW_00885	-1,18	метионил-тРНК синтетаза
GCW_00890	-1,06	ГТФ-связывающий белок, гомолог RAS
GCW_01055	1,50	цитадгезин B
GCW_01150	1,47	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01165	1,33	гипотетический белок
GCW_01190	1,34	гипотетический белок
GCW_01235	-1,09	эстераза
GCW_01300	1,47	гипотетический белок
GCW_01360	1,03	ДНК-полимераза, ϵ -субъединица
GCW_01420	1,06	гипотетический белок
GCW_01550	-1,11	гипотетический белок
GCW_01560	2,13	CgmB
GCW_01580	2,23	металл-зависимая гидролаза
GCW_01640	-2,07	белок SRP системы
GCW_01645	-1,55	тирозил-тРНК синтетаза
GCW_01750	-1,07	АТФ-синтетаза F0F1, субъединица ϵ
GCW_01815	-1,16	тРНК (гуанидин-N(7))-метилтрансфераза
GCW_01910	2,32	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_01925	1,44	гипотетический белок
GCW_01935	1,60	гипотетический белок
GCW_01945	1,76	гипотетический белок
GCW_02000	-1,04	1-дезоксид-Д-ксилоулозо-5-фосфат синтаза
GCW_02055	1,82	гипотетический белок
GCW_02085	1,10	эндонуклеаза IV
GCW_02105	1,07	протеаза Lon
GCW_02120	1,12	ацетил-КоА гидролаза
GCW_02125	1,54	КоА трансфераза
GCW_02130	1,79	ацетил-КоА гидролаза
GCW_02220	1,80	гипотетический белок
GCW_02335	-1,23	гистоноподобный белок HU
GCW_02340	-1,08	гипотетический белок
GCW_02395	1,41	гипотетический белок
GCW_02415	1,35	гипотетический белок
GCW_02475	1,05	гипотетический белок
GCW_02485	-1,26	лейцил-тРНК синтетаза
GCW_02585	-1,82	гипотетический белок
GCW_02590	-1,21	пептидаза M17
GCW_02600	4,45	гипотетический белок
GCW_02665	-1,51	ABC-транспортёр спермидина/путресцина, субстрат-связывающая субъединица
GCW_02670	-1,44	ABC-транспортёр спермидина/путресцина, пермеаза
GCW_02675	-1,42	ABC-транспортёр спермидина/путресцина, пермеаза

GCW_02680	-1,18	ABC-транспортёр спермидина/путресцина, АТФаза
GCW_02770	1,33	белок с CBS доменом
GCW_02775	-1,26	дезоксигуанозин киназа
GCW_02780	-1,96	дезоксигуанозин киназа
GCW_02785	1,88	шаперон ClpB
GCW_02855	2,41	РНК-хеликаза
GCW_02865	1,49	мембранный белок
GCW_02870	-1,13	нуклеотид-связывающий белок с гистидиновой триадой
GCW_02875	1,17	мембранный белок
GCW_02880	1,03	фактор терминации транскрипции NusB
GCW_02925	1,34	ABC-транспортёр пептидов, пермеаза
GCW_02930	1,99	гипотетический белок
GCW_02935	1,25	гипотетический белок
GCW_02990	1,01	рекомбиназа RarA
GCW_03070	1,84	гипотетический белок
GCW_03075	1,00	шаперон DnaK
GCW_03090	-1,66	механочувствительный канал высокой проводимости
GCW_03195	1,41	гипотетический белок
GCW_03215	2,24	гипотетический белок
GCW_03325	-1,08	ABC-транспортёр сахаров, пермеаза
GCW_03340	2,46	гипотетический белок
GCW_03470	-1,90	аспарагин-синтаза
GCW_03480	-1,27	эстераза
GCW_03485	-2,21	гипотетический белок
GCW_03610	-1,47	белок тРНК уридин 5-карбоксиметиламинометил модификации
GCW_03615	-1,53	16S рРНК метилтрансфераза
GCW_03620	-1,03	гипотетический белок
GCW_03655	1,41	гипотетический белок
GCW_03660	1,14	гипотетический белок
GCW_03690	1,27	гипотетический белок
GCW_03735	1,50	компонент PTS системы IIABC
GCW_03740	1,05	гипотетический белок
GCW_03745	1,09	маннозо-6-фосфат изомераза
GCW_03750	-1,06	гипотетический белок
GCW_03765	1,25	CRISPR-ассоциированный белок Cas1
GCW_03770	1,05	CRISPR-ассоциированный белок Cas2
GCW_03800	-1,15	пептидаза S8
GCW_03815	1,13	Белок системы рестрикции-модификации, субъединица S
GCW_03875	1,54	гипотетический белок
GCW_03880	1,12	альдегид дегидрогеназа
GCW_03990	1,00	гипотетический белок
GCW_03995	5,52	гипотетический белок
GCW_90015	2,21	система экспорта липида А, АТФаза/пермеаза
GCW_90016	1,06	ABC-транспортёр антимикробных пептидов, АТФаза
GCW_90066	-1,17	глицерол киназа
GCW_90068	-1,21	глицерол киназа
GCW_90246	-1,06	дезоксцитидилат дезаминаза и дигидрофолат редуктаза
GCW_90867	1,33	шаперон DnaJ
GCW_90874	1,02	гипотетический белок
GCW_90876	2,40	белок экспорта токсинов
GCW_91142	2,62	гипотетический белок
GCW_91197	4,13	гипотетический белок
GCW_91421	1,61	гипотетический белок
GCW_91423	1,08	липопротеин LppH
GCW_91912	2,37	гипотетический белок
GCW_91946	1,00	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92148	-1,07	Хеликаза UvrD

GCW_92301	1,04	гипотетический белок
GCW_92396	-1,28	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_92417	1,25	вариабельный гемагглютинин VlhA
GCW_93187	2,45	глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
GCW_93849	1,01	гипотетический белок
GCW_93876	1,35	альдегид дегидрогеназа

Таблица 5. Открытые рамки считывания, значимо меняющие уровень транскрипции (двоичный логарифм относительного нормализованного покрытия) в осмотическом стрессе, (q-value<0,05).

Локус	Изм.	Функция
GCW_00390	2,9869	лактат дегидрогеназа
GCW_00595	1,7553	сериновая протеаза
GCW_00625	4,5365	гипотетический белок
GCW_01140	4,1081	ДНК-связывающий ферритиноподобный белок
GCW_01235	1,8585	эстераза
GCW_01470	1,0091	гипотетический белок
GCW_01480	2,0714	гипотетический белок
GCW_01535	3,3567	флаводоксин
GCW_01540	1,0963	гипотетический белок
GCW_01575	2,0949	пирофосфатаза
GCW_01635	5,0838	пероксиредоксин
GCW_02335	3,06	гистонотипный белок HU
GCW_02490	4,6754	фосфолипид-связывающий белок
GCW_02495	4,8613	фосфолипид-связывающий белок
GCW_02705	2,9201	метионин-сульфоксид редуктаза В
GCW_02745	1,7639	пируват-дегидрогеназа субъединица E1 β
GCW_02750	1,5816	пируват-дегидрогеназа субъединица E1 α
GCW_02785	3,5195	шаперон ClpB
GCW_02860	2,5435	енолаза
GCW_02895	4,2564	гипотетический белок
GCW_02980	3,7188	азоредуктаза
GCW_03005	4,4284	пероксиредоксин
GCW_03075	2,6771	шаперон DnaK
GCW_03470	3,8198	аспарагин-синтаза
GCW_03495	1,19	фосфотрансацетилаза
GCW_03600	1,783	пептид деформилаза
GCW_03930	1,3577	метионин-сульфоксид редуктаза А
GCW_03940	1,4449	гипотетический белок
GCW_92861	4,943	гипотетический белок
GCW_93852	1,4857	гипотетический белок

Таблица 6. Открытые рамки считывания, значимо увеличивающие транскрипцию (двоичный логарифм относительного нормализованного покрытия) в стационарной фазе, (q-value<0,05)

Локус	Ген	H2O2	NaCl	46C-5	46C-15	46C-30
GCW_03405	Хеликаза структуры Холидея RuvB	-	-	-	-	-
GCW_93806	Аденин-метилаза HsdM	-1,27	-	-	-	2,62
GCW_00520	Мембранный белок	-	-	-	-	-
GCW_00655	тРНК-псевдоуридин синтаза В	-	-	-	-	-
GCW_00960	Сериновая протеаза семейства субтилизина	-	-	-	1,67	1,85
GCW_00965	Мембранный белок	-	-	-1,85	-	-
GCW_03690	Гипотетический белок	-	-	-	1,08	-
GCW_03750	Гипотетический белок	1,13	-	-2,34	-1,22	-
GCW_03865	Гипотетический белок	-	-	-	-	-
GCW_03935	Хеликаза семейства SNF2	-	-	1,54	1,18	1,87
GCW_03965	Гипотетический белок	-	1,16	-	-	-

GCW_93971	АТФ-синтетаза F ₀ F ₁ -типа, бета субъединица	-	-	-1,17	-	-
GCW_04005	Металл-зависимая фосфогидролаза	-	-	-	-	1,42
GCW_00080	Гипотетический белок	-	-1,53	-1,09	-	-
GCW_00555	Гипотетический белок	-	-	-	-	-
GCW_01135	Пермеаза аминокислот PotE	-	-	1,26	2,12	2,11
GCW_01145	Гемагглютинин семейства VlhA	-	-	-1,69	-	-
GCW_01255	Гипотетический белок	-	-	-	-1,03	-1,18
GCW_01365	5'-3' экзонуклеаза	-	-	-	1,04	2,84
GCW_01390	АТФ-аза системы транспорта катионов	-	-	-	1,16	2,58
GCW_01450	Гипотетический белок	-	-	-	2,31	3,46
GCW_01515	Аспарагин-синтаза A	-	-	-	2,13	2,31
GCW_01520	Гипотетический белок	-	-	-	1,36	1,37
GCW_01525	Мембранная метилаза и транспортёр	-	-	-	1,21	1,15
GCW_01560	Цитадгезин CrmB	-	-	-	-	-
GCW_01620	Шаперон DnaJ	1,04	1,14	-	-	-
GCW_01840	Цитадгезин Hlp2	-	-	-	2,95	5,05
GCW_02300	Гипотетический белок	-	-	-	-	-
GCW_92396	Гемагглютинин семейства VlhA	-	-	1,27	2,63	2,93
GCW_02635	Транскрипционный фактор WhiA	-	-	-	-	-
GCW_02760	Ацетат/пропионат киназа	-	1,56	-	-	1,37
GCW_03140	Пермеаза	-	-	-1,26	-	-

Таблица 7. Изменение транскрипции антисмысловых РНК *M. gallisepticum* (двоичный логарифм относительного нормализованного покрытия) в разных состояниях.

8.2. Транскрипционное профилирование генов *M. gallisepticum* методом ОТ-ПЦР в реальном времени

Локус S6	Ген	Лог. ф.	SD	46C-5	SD	46C-15	SD	46C-30	SD	H2O2	SD	NaCl	SD
GCW_02785	clpB	23,71	0,27	19,18	0,35	19,32	0,83	21,03	0,15	23,22	0,05	21,62	0,44
GCW_03075	dnaK	21,78	0,26	19,54	0,24	20,60	0,37	20,92	0,11	21,85	0,09	20,77	0,25
GCW_02105	lon	24,06	0,06	21,22	0,22	21,43	0,39	21,83	0,24	23,38	0,07	22,78	0,18
GCW_02710	groEL	22,98	0,43	23,57	0,17	25,04	0,07	25,38	0,04	24,05	0,33	24,50	0,01
GCW_00415	dnaJ	27,06	0,07	26,26	0,34	27,61	0,32	27,82	0,09	27,79	0,02	25,13	0,27
GCW_00845	dnaJ2	26,42	0,22	24,61	0,23	23,81	0,19	23,72	0,11	26,13	0,26	23,97	0,40
GCW_01610	dnaJ4	25,64	0,13	25,38	0,20	24,88	0,29	25,43	0,23	24,08	0,18	25,47	0,20
GCW_01620	dnaJ5	27,41	0,27	26,35	0,36	25,30	0,15	25,77	0,14	27,48	0,19	28,08	0,45
GCW_01900	dnaJ6	24,71	0,04	24,11	0,11	22,20	0,29	22,41	0,24	25,22	0,09	24,15	0,21
GCW_04075	dnaJ7	24,61	0,36	25,05	0,34	22,18	0,19	21,71	0,21	25,91	0,08	25,37	0,63
GCW_01905	grpE	22,99	0,21	23,17	0,37	21,97	0,23	21,78	0,24	23,27	0,10	23,82	0,17
GCW_02005	hrcA	27,30	0,46	27,57	0,14	28,61	0,44	28,69	0,00	27,76	0,45	28,41	0,18
GCW_02100	tig	23,77	0,24	23,63	0,12	23,35	0,25	24,01	0,06	24,28	0,20	24,22	0,40
GCW_03080	MGA_0280	28,99	0,18	26,72	0,35	25,74	0,54	25,13	0,10	29,47	0,33	28,55	0,45
GCW_02930	MGA_0226	23,70	0,24	25,74	0,09	26,76	0,05	26,95	0,14	22,98	0,77	21,80	0,41
GCW_00085	MGA_0649	25,05	0,23	23,64	0,28	23,03	0,43	23,26	0,28	25,88	0,11	24,92	0,47
GCW_01140	MGA_0965	26,00	0,40	24,53	0,39	23,55	0,40	23,61	0,35	26,30	0,14	25,50	0,38
GCW_01335	16S	10,07	0,46	9,69	0,05	11,09	0,83	13,05	1,13	9,85	0,06	10,26	0,02
GCW_00395	23S	11,28	0,05	11,29	0,01	11,17	0,09	11,98	0,98	11,27	0,01	11,29	0,02
GCW_02860	eno	23,49	0,34	23,61	0,26	23,68	0,57	24,53	0,16	25,55	1,09	25,05	0,23
GCW_01780	gapd	20,64	0,14	21,40	0,34	22,76	0,09	23,45	0,06	22,70	0,36	21,69	0,43
GCW_03290	tpiA	23,36	0,33	22,61	0,20	23,63	0,42	24,99	0,24	24,33	0,53	24,47	0,32
GCW_01315	tuf	19,77	0,39	20,27	0,31	21,58	0,40	22,20	0,09	20,16	0,13	20,45	0,35
GCW_00475	tsf	22,43	0,14	23,49	0,11	22,62	0,34	23,38	0,02	23,05	0,25	22,72	0,25
GCW_01635	osmC	23,12	0,59	23,42	0,23	25,37	0,79	26,04	0,48	21,89	0,54	24,63	0,57
GCW_03005	MGA_0252	23,28	0,10	23,10	0,44	23,44	0,28	23,28	0,31	22,50	0,23	23,06	0,33
GCW_00065	glpF	26,08	0,31	25,18	0,27	25,62	0,35	26,03	0,17	27,57	0,21	27,11	0,43
GCW_00075	glpO	24,15	0,13	24,43	0,22	26,04	0,22	26,80	0,43	25,47	0,71	24,98	0,09
GCW_90066	glpK	25,59	0,50	25,11	0,14	26,48	0,51	27,01	0,20	26,93	0,60	26,93	0,22
GCW_01615	gpsA	25,60	0,25	25,11	0,16	24,45	0,06	24,86	0,34	25,58	0,13	25,88	0,17
GCW_02750	acoA	20,65	0,30	21,85	0,06	22,49	0,12	23,14	0,22	22,02	0,57	21,20	0,17
GCW_02745	acoB	21,42	0,24	22,55	0,03	23,12	0,08	23,86	0,39	22,97	0,40	22,15	0,01
GCW_02740	aceF	21,08	0,34	21,80	0,02	23,42	0,06	23,65	0,02	21,54	0,62	22,03	0,23
GCW_00390	ldh	21,25	0,29	21,02	0,49	23,06	0,53	23,67	0,02	22,84	0,34	20,33	0,04
GCW_02760	ackA	26,16	0,67	25,91	0,10	25,30	0,15	26,32	0,05	26,87	0,64	26,83	0,44
GCW_01785	pgk	21,28	0,07	21,99	0,11	23,36	0,03	23,89	0,16	23,41	0,29	22,87	0,18
GCW_03700	fba	22,58	0,43	22,92	0,05	25,66	0,46	26,38	0,14	22,94	0,46	23,01	0,19
GCW_03575	pgi	24,33	0,37	25,05	0,32	26,19	0,24	26,85	0,06	26,32	0,55	25,25	0,24
GCW_02725	pfkA	23,68	0,16	23,86	0,02	25,06	0,46	25,29	0,12	24,19	0,52	23,86	0,01
GCW_01975	pgm-b	35,46	0,40	31,56	0,36	31,34	0,45	32,21	0,04	34,70	0,15	35,30	0,61
GCW_03285	pgm	23,54	0,52	22,44	0,26	23,17	0,60	24,92	0,08	24,61	0,45	24,84	0,06
GCW_02720	pykF	23,63	0,18	23,78	0,25	25,16	0,05	25,52	0,06	24,42	0,15	24,79	0,04
GCW_00160	tktA1	25,14	0,16	24,36	0,10	25,14	0,57	25,23	0,17	25,36	0,35	23,22	0,30
GCW_03235	tktA2	26,71	0,30	25,85	0,32	25,85	0,35	25,93	0,03	27,25	0,06	25,95	0,11
GCW_00795	rpiB	23,42	0,21	23,29	0,51	23,41	0,30	23,82	0,04	24,06	0,10	24,07	0,28
GCW_03495	eutD	21,55	0,45	21,85	0,10	21,65	0,25	21,34	0,12	22,16	0,73	22,13	0,27
GCW_03255	prsA	24,29	0,43	25,65	0,23	24,02	0,24	24,57	0,04	24,13	0,46	23,94	0,05
GCW_02735	lpd	21,30	0,18	22,17	0,52	23,31	0,26	23,48	0,26	21,71	0,14	22,49	0,49
GCW_03295	cpsG	25,21	0,28	23,95	0,21	24,71	0,44	26,09	0,05	26,32	0,36	25,77	0,05
GCW_02755	MGA_0167	21,54	0,32	22,97	0,24	23,38	0,37	24,23	0,03	23,36	0,88	22,22	0,14

GCW_02490	MGA_0090	24,99	0,09	25,07	0,44	25,76	0,63	27,33	0,20	23,94	0,27	26,11	0,10
GCW_02495	MGA_0091	24,09	0,01	23,77	0,20	24,98	0,70	26,12	0,25	22,62	0,06	24,51	0,22
GCW_01270	hatA	26,86	0,48	22,11	0,79	23,41	1,00	26,04	0,07	25,48	0,85	26,17	0,47
GCW_03695	rpoE	23,21	1,08	22,66	0,19	25,36	0,40	25,96	0,14	22,78	0,48	22,27	0,47
GCW_01075	spoT	28,72	0,40	27,61	0,25	27,88	1,00	27,48	0,22	29,11	0,35	28,43	0,40
GCW_02645	MGA_0125	25,28	0,22	24,32	0,14	26,12	0,35	27,02	0,07	25,75	0,18	24,59	0,39
GCW_02635	MGA_0123	25,75	0,05	24,37	0,32	25,65	0,41	26,57	0,14	25,55	0,28	25,42	0,29
GCW_00440	MGA_0765	28,87	0,55	27,83	0,18	27,52	0,50	28,82	0,97	30,07	0,83	28,59	1,55
GCW_04025	hprK	24,17	0,30	24,94	0,25	24,76	0,95	23,11	0,05	23,26	0,02	24,29	0,28
GCW_03690	MGA_0459	27,27	0,21	26,92	0,18	27,49	0,37	27,61	0,82	27,28	0,00	26,25	0,57
GCW_03310	deoC2	23,37	0,31	23,60	0,29	25,32	0,70	26,55	0,04	23,82	0,09	23,87	0,14
GCW_03745	manA	31,83	0,42	29,53	0,47	29,69	0,78	29,72	0,18	34,35	0,14	31,04	0,34
GCW_03735	fruA	26,79	0,35	26,06	0,20	24,58	0,59	24,31	0,04	28,39	0,18	24,98	0,37
GCW_00765	ptsG1	21,30	0,15	22,49	0,12	24,13	0,27	24,22	0,04	23,20	0,93	21,06	0,12
GCW_03100	ptsG2	26,36	0,18	25,20	0,35	23,19	0,13	23,49	0,17	27,35	0,16	25,59	0,29
GCW_04065	gyrA	25,55	0,13	25,24	0,27	24,32	0,47	23,68	0,27	26,83	0,04	26,62	0,23
GCW_04070	gyrB	26,71	0,23	25,50	0,18	24,00	0,54	23,33	0,18	27,68	0,29	26,23	0,47
GCW_02325	parC	27,27	0,08	25,99	0,54	26,69	0,15	27,21	0,08	27,58	0,21	27,34	0,20
GCW_02330	parE	25,67	1,61	26,61	0,58	26,60	1,56	26,39	0,03	25,35	0,44	24,48	0,21
GCW_03410	ruvA	27,75	0,25	25,98	0,33	24,54	0,64	24,68	0,10	28,00	0,18	26,74	0,23
GCW_03405	ruvB	26,90	0,64	25,70	0,36	23,90	0,20	23,52	0,18	27,31	0,11	25,92	0,16
GCW_03920	ligA	27,54	0,21	25,68	0,53	24,34	0,19	24,46	0,32	27,57	0,10	27,19	0,36
GCW_03385	recR	27,48	0,34	25,33	0,34	25,38	0,38	25,58	0,35	26,34	0,06	26,23	0,20
GCW_00470	uvrA	26,06	0,38	25,08	0,23	23,99	0,08	23,93	0,16	26,08	0,32	25,90	0,01
GCW_00205	uvrB	27,39	0,41	27,01	0,50	28,02	0,38	28,16	0,01	27,04	0,47	27,24	0,66
GCW_02010	uvrC	27,40	0,37	26,67	0,38	26,39	0,04	26,41	0,25	27,26	0,54	26,87	0,11
GCW_92149	uvrD	25,84	0,50	25,14	0,44	23,95	0,11	23,88	0,33	26,69	0,33	26,11	0,09
GCW_02695	recA	27,52	0,30	25,40	0,28	25,44	0,24	25,72	0,44	26,34	0,16	26,41	0,22
GCW_01370	nei	27,08	0,53	27,45	0,33	26,82	0,43	25,97	0,42	27,45	0,58	26,17	0,33
GCW_03930	msrA	24,01	0,45	24,99	0,28	25,72	0,35	25,58	0,25	23,63	0,24	24,52	0,60
GCW_02085	nfo	26,25	0,34	25,59	0,11	24,66	0,40	25,23	0,15	25,19	0,21	25,06	0,38
GCW_00810	hup1	24,45	0,24	24,59	0,47	25,95	0,25	26,40	0,03	26,15	0,38	25,47	0,29
GCW_02335	hup2	24,88	0,56	26,21	0,14	27,21	0,88	27,57	0,19	25,94	1,02	25,63	0,08
GCW_03435	ung	27,55	0,20	25,78	0,17	23,82	0,46	24,06	0,12	27,44	0,14	25,75	0,09
GCW_03245	umuC	29,18	0,14	26,72	0,44	28,52	0,42	27,90	0,12	29,56	0,20	27,38	0,40
GCW_00770	putA	28,01	3,68	27,08	0,22	28,79	3,67	26,64	0,44	25,05	0,15	24,98	0,04
GCW_02665	potD	24,99	0,11	25,51	0,07	24,95	0,40	25,26	0,35	24,17	0,43	26,55	0,19
GCW_03110	spxA	26,17	0,26	25,68	0,29	24,17	0,75	24,88	0,05	27,23	0,63	26,26	0,29
GCW_02090	MGA_1295	26,54	0,36	25,42	0,32	24,45	0,32	25,32	0,26	24,89	0,23	25,57	0,49
GCW_93946	MGA_0578	30,18	0,16	27,11	0,73	23,61	0,41	23,58	0,30	30,00	0,44	30,32	0,03
GCW_02245	mraW	26,25	0,17	23,87	0,76	22,03	0,84	22,55	0,34	27,28	0,94	27,30	0,24
GCW_03090	mscL	27,28	0,02	25,56	0,56	24,40	0,36	24,64	0,03	26,93	0,48	28,20	0,58
GCW_03085	MGA_0281	29,33	0,08	26,72	0,73	25,00	0,83	24,69	0,04	29,04	0,51	28,62	0,41
GCW_93751	MGA_0518	28,98	0,57	23,09	0,52	24,15	1,10	24,01	0,26	29,75	0,36	28,45	0,32
GCW_02240	MGA_0028	28,16	0,14	24,08	0,85	21,44	0,60	21,84	0,23	29,00	1,12	27,78	0,44
GCW_02300	MGA_0048	28,74	0,16	25,27	0,40	24,67	0,34	25,05	0,44	29,10	0,49	28,70	0,41
GCW_92301	MGA_0049	31,47	0,01	28,88	0,82	26,04	0,06	26,70	0,13	31,70	0,03	28,98	0,64
GCW_01560	MGA_1119	29,78	0,22	29,55	0,59	27,60	0,64	27,64	0,10	28,70	0,77	27,66	0,46

Таблица 8. Транскрипция некоторых генов *M. gallisepticum* по данным ПЦР в реальном времени. Для каждого условия приведено нормализованное значение транскрипции и его стандартное отклонение (SD). Краткие обозначения условий – лог. ф. – логарифмическая фаза, 37C, 46C-5, 46C-15, 46C-30 – тепловой стресс 46C 5, 15 и 30 минут, H2O2 – окислительный стресс, NaCl – осмотический стресс, ст. ф. – стационарная фаза, ст-46 – тепловой стресс в стационарной фазе, СССР – обработка СССР, ново. – обработка новобиоцином, рез. – обработка резерпином.

Локус S6	Ген	Ст. ф.	SD	Ст-46	SD	СССР	SD	Ново.	SD	Рез.	SD
GCW_02785	clpB	19,83	0,72	19,66	0,68	17,73	0,60	25,43	0,75	20,64	0,36
GCW_03075	dnaK	19,89	0,10	19,89	0,45	18,36	0,95	22,47	0,96	19,90	0,12
GCW_02105	lon	25,09	0,92	25,56	0,82	21,42	0,22	28,76	0,70	23,77	0,12
GCW_02710	groEL	25,62	0,44	25,47	0,57	22,68	0,45	27,66	0,71	23,44	0,04
GCW_00415	dnaJ	34,70	1,09	34,10	1,96	29,18	0,56	29,87	0,41	29,05	0,09
GCW_00845	dnaJ2	29,20	0,91	29,02	1,12	23,37	0,96	28,01	1,88	24,99	0,17
GCW_01610	dnaJ4	31,05	0,90	31,24	1,72	26,34	0,22	25,70	0,66	25,59	0,36
GCW_01620	dnaJ5	35,15	2,07	35,59	1,95	30,02	0,08	28,67	1,22	28,99	0,25
GCW_01900	dnaJ6	30,09	2,00	30,71	1,93	25,55	0,37	30,37	0,22	25,24	0,10
GCW_04075	dnaJ7	33,60	1,14	33,62	0,71	28,24	0,18	24,73	0,89	26,71	0,50
GCW_01905	grpE	25,43	1,21	25,48	1,39	23,95	0,13	27,33	0,46	24,35	0,08
GCW_02005	hrcA	33,05	0,54	31,85	2,91	29,09	0,13	33,06	0,28	27,57	0,15
GCW_02100	tig	28,86	0,71	29,26	1,23	25,07	0,11	30,69	0,48	24,21	0,25
GCW_03080	MGA_0280	35,76	1,37	36,40	0,76	33,04	0,13	33,52	0,10	31,11	0,21
GCW_02930	MGA_0226	30,76	1,49	30,97	2,24	24,42	0,41	28,56	0,20	24,91	0,18
GCW_00085	MGA_0649	25,53	1,65	25,02	1,57	24,81	0,50	26,93	1,49	24,45	0,05
GCW_01140	MGA_0965	24,23	0,93	24,19	0,99	25,97	0,25	32,81	1,14	25,00	0,03
GCW_01335	16S	10,57	0,05	10,37	0,29	10,16	0,26	10,49	0,48	10,53	0,04
GCW_00395	23S	11,26	0,04	10,89	0,52	11,47	0,16	11,25	0,04	11,28	0,02
GCW_02860	eno	23,38	0,71	23,21	1,03	23,25	0,84	27,68	3,10	22,87	0,09
GCW_01780	gapd	24,26	0,60	24,36	0,93	22,97	0,52	24,33	1,38	21,08	0,02
GCW_03290	tpiA	26,06	0,99	26,82	1,20	22,69	0,97	26,21	0,81	22,91	0,06
GCW_01315	tuf	21,95	0,24	22,03	0,39	20,97	1,07	22,81	0,56	20,80	0,02
GCW_00475	tsf	29,09	0,88	29,13	1,26	24,62	0,58	27,15	1,13	22,56	0,32
GCW_01635	osmC	18,39	0,98	18,18	1,17	20,83	0,74	23,68	0,22	21,90	0,17
GCW_03005	MGA_0252	19,17	1,25	19,24	1,38	21,29	0,42	27,42	0,36	22,29	0,10
GCW_00065	glpF	31,97	1,32	32,27	1,25	28,67	0,56	27,55	0,33	26,62	0,40
GCW_00075	glpO	30,02	0,67	29,77	0,97	27,06	0,31	28,28	0,56	24,61	0,22
GCW_90066	glpK	32,21	1,09	31,39	2,74	27,59	0,23	29,37	1,37	25,90	0,22
GCW_01615	gpsA	33,03	1,35	31,55	4,29	28,44	0,37	26,80	1,32	26,96	0,15
GCW_02750	acoA	20,81	0,91	20,66	1,03	21,16	0,37	23,21	0,76	21,06	0,02
GCW_02745	acoB	20,84	1,01	20,82	1,22	21,96	0,97	23,95	1,02	21,79	0,02
GCW_02740	aceF	25,81	1,10	26,37	0,44	20,84	0,11	25,78	0,75	21,35	0,22
GCW_00390	ldh	18,12	0,84	18,15	1,16	22,67	0,31	24,94	1,07	21,82	0,29
GCW_02760	ackA	29,07	0,56	29,12	0,82	25,32	0,06	28,87	0,72	26,11	0,06
GCW_01785	pgk	25,20	0,65	25,34	0,90	23,71	0,86	24,76	1,36	21,87	0,12
GCW_03700	fba	25,57	0,90	26,02	1,31	23,56	0,30	28,19	0,66	23,41	0,02
GCW_03575	pgi	30,02	0,83	30,11	1,43	26,86	0,04	27,19	0,45	25,45	0,10
GCW_02725	pfkA	27,61	0,46	27,74	0,91	23,65	0,15	27,76	0,27	23,01	0,27
GCW_01975	pgm-b	36,59	1,29	35,28	3,05	33,71	0,70	37,47	0,54	36,68	0,60
GCW_03285	pgm	27,13	0,95	28,09	1,42	23,19	0,09	27,44	0,53	24,38	0,23
GCW_02720	pykF	26,41	1,02	26,37	1,26	23,30	0,19	27,53	1,31	23,59	0,13
GCW_00160	tktA1	29,26	1,73	30,09	2,20	24,96	0,25	29,72	1,28	25,19	0,06
GCW_03235	tktA2	34,48	2,15	30,02	2,99	29,25	1,51	30,60	0,51	28,78	0,32
GCW_00795	rpiB	26,76	1,57	27,68	1,15	23,92	0,37	28,10	1,18	23,47	0,23
GCW_03495	eutD	22,82	0,21	22,70	0,32	21,44	0,34	25,76	0,24	21,66	0,23
GCW_03255	prsA	33,25	1,95	33,55	1,16	27,68	1,17	29,39	0,63	25,49	0,03
GCW_02735	lpd	25,80	1,50	26,19	1,35	21,56	0,40	25,62	1,08	21,55	0,16
GCW_03295	cpsG	27,23	0,77	28,10	1,23	24,49	0,62	27,75	1,27	25,31	0,08
GCW_02755	MGA_0167	22,78	1,01	22,81	1,25	22,03	0,96	23,90	1,29	21,55	0,25
GCW_02490	MGA_0090	19,68	0,92	19,82	1,17	21,82	1,66	28,37	2,59	23,62	0,04
GCW_02495	MGA_0091	18,98	0,88	19,08	1,13	20,92	0,96	27,70	1,61	23,19	0,06
GCW_01270	hatA	28,57	1,16	28,84	1,35	22,80	0,40	29,36	0,09	26,80	0,00
GCW_03695	rpoE	26,52	0,63	26,95	0,93	24,03	0,05	27,89	0,30	23,06	0,08
GCW_01075	spoT	35,28	1,31	36,49	1,62	32,34	0,94	37,04	2,96	30,92	0,77

GCW_02645	MGA_0125	30,43	1,10	30,09	1,95	27,71	0,26	31,47	1,64	27,08	0,05
GCW_02635	MGA_0123	32,38	1,24	32,75	1,91	25,96	0,14	31,63	0,47	26,87	0,14
GCW_00440	MGA_0765	33,89	0,86	34,59	0,82	27,29	0,01	29,61	0,33	29,19	0,37
GCW_04025	hprK	31,67	1,19	32,67	1,15	25,14	0,07	28,15	0,15	24,56	0,08
GCW_03690	MGA_0459	33,11	1,09	33,51	1,84	28,83	0,92	27,99	0,10	28,48	0,13
GCW_03310	deoC2	26,52	0,84	27,29	0,12	23,85	0,21	26,61	0,63	23,85	0,18
GCW_03745	manA	37,19	0,76	33,97	0,72	28,59	4,89	34,53	0,42	27,62	3,18
GCW_03735	fruA	33,59	0,81	33,79	0,38	30,90	0,37	34,14	0,70	29,33	0,16
GCW_00765	ptsG1	28,46	1,00	28,48	1,30	25,61	0,63	25,36	1,22	21,76	0,07
GCW_03100	ptsG2	32,93	1,34	30,74	2,77	27,97	0,19	31,68	1,15	27,04	0,49
GCW_04065	gyrA	32,56	1,64	33,56	1,49	27,24	0,52	26,07	1,31	27,17	0,02
GCW_04070	gyrB	31,98	1,08	32,60	1,12	28,22	0,38	26,54	1,39	27,75	0,35
GCW_02325	parC	35,79	5,16	36,68	4,59	29,49	0,36	30,50	0,93	28,55	0,28
GCW_02330	parE	32,57	2,75	32,96	2,91	26,87	0,30	28,75	0,54	26,27	0,34
GCW_03410	ruvA	31,59	0,44	31,94	0,32	28,23	0,18	30,05	1,01	28,28	0,21
GCW_03405	ruvB	32,76	0,73	32,47	0,80	28,52	0,82	29,49	0,50	28,05	0,20
GCW_03920	ligA	33,11	1,41	33,62	1,39	28,43	0,84	32,57	1,09	28,61	0,12
GCW_03385	recR	31,17	1,48	32,21	1,59	28,09	0,36	30,22	0,75	26,94	0,05
GCW_00470	uvrA	31,96	1,40	32,48	1,78	26,62	0,12	30,69	0,20	27,02	0,17
GCW_00205	uvrB	33,47	1,96	33,48	1,49	27,73	0,19	31,86	0,59	29,25	0,20
GCW_02010	uvrC	31,45	1,46	32,28	1,49	27,86	0,08	32,92	0,65	28,36	0,07
GCW_92149	uvrD	30,99	1,89	31,58	1,91	26,05	0,06	30,16	0,78	27,00	0,05
GCW_02695	recA	31,27	1,46	32,41	1,59	26,93	0,52	30,01	0,68	28,09	0,16
GCW_01370	nei	33,14	0,22	33,54	1,02	30,58	0,25	33,58	0,42	27,71	0,40
GCW_03930	msrA	25,14	0,65	24,71	0,69	24,89	0,20	30,41	0,46	25,00	0,02
GCW_02085	nfo	35,37	1,54	34,87	1,26	28,70	0,00	30,80	3,14	27,27	0,15
GCW_00810	hup1	30,77	1,42	30,92	1,22	24,88	0,40	28,52	1,50	24,43	0,07
GCW_02335	hup2	24,50	1,62	24,51	1,72	29,92	0,13	30,29	1,12	30,60	0,28
GCW_03435	ung	35,69	1,18	35,71	2,35	30,83	0,74	29,49	0,05	29,25	0,29
GCW_03245	umuC	37,03	1,50	37,49	1,39	33,59	0,19	34,14	0,93	31,15	0,39
GCW_00770	putA	28,37	0,34	28,66	0,71	24,72	0,82	30,36	0,56	24,75	0,03
GCW_02665	potD	32,79	1,50	33,30	1,38	27,25	0,53	27,08	0,05	25,96	0,09
GCW_03110	spxA	32,52	1,34	33,11	1,71	26,71	0,79	31,78	1,07	25,95	0,07
GCW_02090	MGA_1295	33,74	1,11	34,47	1,54	28,90	0,31	33,35	0,26	28,59	0,14
GCW_93946	MGA_0578	31,31	0,77	32,17	0,06	29,65	1,25	31,96	0,13	30,26	0,22
GCW_02245	mraW	27,26	1,08	27,06	1,05	26,12	0,51	29,65	0,14	25,16	0,00
GCW_03090	mscL	32,81	0,15	32,85	0,81	28,90	0,08	29,14	0,58	26,89	0,06
GCW_03085	MGA_0281	35,79	1,33	36,13	0,38	30,97	0,09	31,96	0,32	29,41	0,06
GCW_93751	MGA_0518	35,34	1,12	35,48	0,53	30,85	0,22	33,41	0,89	27,74	0,33
GCW_02240	MGA_0028	28,88	1,81	29,37	1,83	27,43	0,23	30,66	0,23	28,00	0,03
GCW_02300	MGA_0048	36,46	0,06	36,28	1,12	30,82	0,57	29,53	0,46	29,02	0,27
GCW_92301	MGA_0049	36,77	0,69	37,24	1,44	32,33	0,36	30,39	0,80	32,06	0,05
GCW_01560	MGA_1119	35,34	0,42	34,91	0,27	32,06	0,14	30,03	0,81	30,13	0,20

Таблица 8 (продолжение). Транскрипция некоторых генов *M. gallisepticum* по данным ПЦР в реальном времени.

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
GCW_02240	GGCTGATCAAACTATTATGCAG	TGATCAGATCTTCGTTACGGT
GCW_02300	TAAGTCTTCAGTTTGCTTCACG	TACTCTTCTAGTTGCTAGTTGTCC
GCW_92301	TATCAAAGCCTTTCTAGCAACG	CACTATAAGTAGGTTTAGCTCAGG
GCW_02490	GAATCTAAGCAATCAGCATACGG	GAAATCACCTACATAATACGGCTTG
GCW_02495	CGTGAGATAAAATTGAAGGTGC	TGTATAGGTGAGTGTCATCTGG
GCW_02635	CAAGAGGTTAAAGTGAGATCTGTG	GCTGTTGTTCTTCTAGTTTCGTG
GCW_02645	TATGACCAAAATAAGGAAGTTGCC	CTTAGAATCTGGTAACAAGTGAAG

GCW_02755	AATACTGTGGTGAATTGAAGG	TCAGTGCAACTAAGTATCCCA
GCW_02930	GCAAAGTTACTGTAACACCAGG	CGGCATTAACCATTATTTACC
GCW_03005	ATTCATCAGCAACTAAAGTACC	TCATCAATTACGATTCTTCCAG
GCW_03080	CAGATGCAATTACGGTTGTAGG	TGATTTACGTATTCCAAACGCT
GCW_03085	ATTATCTGTGTCCTTTTCATCCG	CACTTACTTGAGCTAAGAAAGCAG
GCW_03585	GATTAAGCTGGTTAAACGATCTCC	GTAACCTTCTGAATCCCTTCAACC
GCW_93752	CAATAGTTTTAGGAAGACACGG	ACAGCATCACCATTATTTCCAG
GCW_93946	GAATGTCTTCGTGTTAAGTGTC	AAAGCTAATGGGTTGATTGCTC
GCW_00085	CCAATATAATAGCGAAATGGCTG	GTTAATTAAGCCACTTCAGCG
GCW_00440	GTACAACCGATTTGATTCCAAG	AGTTCTTTTACGATATCACAGATCC
GCW_01140	AACTTTCACTGAAATATCAAAGGTG	TTTCATCTAAGATTGGTTGAACACG
GCW_01560	AATCTAATCCAGGGACAGTTTC	GTGGCTACTAGAACATCATATCTAGG
GCW_01460	AATACCGAATCACCAAACCTAG	ATGTTTTTGGGAATAATAATCGTAC
MGA_16S	AAGTAACGACTAACTATGTGCC	TAGGGTATCTAATCCTATTTGCTCC
MGA_23S	AGAAATACGTAGTCGATGGAAG	GAGTTCCTTAGCTATAGTTCACTC
MGA_aceF	TAAACCGATCTTCTTAGAGCGAG	TACCGTAAGCAAGTTAAGGATG
MGA_ackA	GAAGCACCATTTCTTAAGTGAC	AGATCTATGAATTAGCCAAGCTC
MGA_acoA	GTCTTCTGTGTAAACAACAACC	CGATTGGATCTGATTTCTTAGCTTC
MGA_acoB	CTAAAGCTTTAATTCCACCACCC	GTATTATACGGTCAAGACGCTG
MGA_clpB	GAAAGATTACAGGCAAAAGGTG	GCGCTCTTCTCTTAGTACTGC
MGA_cpsG	ATCTTTACTGGTCAACATGGAG	GTAATAAGCAAAGATGATCCCC
MGA_deoC2	AAGTTTATGAAGCCAAAACCTC	CTTATTTTGAAGTGGCTTGTTC
MGA_dnaJ	TCTTTAGCTTTGAAGGTGTGAG	GTGAAAGTAGTTCATCGTCTGC
MGA_dnaJ_2	CATGTAGTGATTGTAATGGCGA	GGTTATCGCGTAGTTCAAACAC
MGA_dnaJ_4	CCCGATGTTAATAAAGCTCCTG	TCAATCTTACGACTCATCTCAG
MGA_dnaJ_5	AGCTGAGTTTCAGATTGAAGAC	TAAGCTGATCTAACATCATCAC
MGA_dnaJ_6	GCGTATGAAGTTCTATCTAACCC	TTAGCTTGATTTGCACTAGCAC
MGA_dnaJ_7	AGTTAAGAGACTAATTAATCGACCAG	CAACATTACCCTTACCAAAGAAGCTC
MGA_dnaK	TTACTCCAGAAGAAGTTTCTGC	TAACCTCGAAAGTACCATCAGC
MGA_eno	GCGATCTTAGCAGTATCAATGG	ACCTTCATCACCTTTGTTAGTA
MGA_eutD	GAAGTTGATGGTGAAGTATGTGG	AACAGATTACCTACACCTGAG
MGA_fba	GACCATGGTACTTATGAAGGTG	AAGTAGGGGGATAAATTCGGTG
MGA_fruA	TTCCAAACCACAATCAAACCAG	TTAATGTGAATGCGACTACACC
MGA_gapd	ACGACTTAACTGATGCTAAGAC	TGGTTCACGTTGTAAACTACAG
MGA_glpF	CAGCTAAAAGAATCATAGTGCC	GTGGTGTGGTTATTAGTATCCAAG
MGA_glpK	CTCGTTGAGATCACAACTAGG	TCTCAGGGACTAAGATTCTGTTG
MGA_glpO	GATGAATTGCTACTGAAGAGGTG	ATTCATGGTGGTTTTGATCCTG
MGA_gpsA	TAATGTAGCTAAGGGAATGGACG	TGTTCAAAAACAATCCCAGTCC
MGA_groEL	ACAACAGCTACAATCTTAACTC	CCCTTGAAGTCTAAACCATCAG
MGA_grpE	TTAGAGTTTGCTTCACTTGACC	GTTTGAGGTTGTTCTTGTTCAC
MGA_gyrA	ATGATGCTTCAGAACAAAGAAC	CAATCTCAGATTTAGCCGAAC
MGA_gyrB	AATAACATTACACCAACCAAGG	TAATCTTAGCAGCTTCTTCTGGA
MGA_hatA	ATGAGAACAGAATGTGAGATGG	GGTTTGTACCGATTTCTCTTCC
MGA_hprK	AGAAGTATATGGTGAAGGGTTTC	GTTTCGTTCGAAATTATAAGGTTGG
MGA_hrcA	AATGATCGGTTAGTTGATACCC	TTCAATCCCAATATCTTGACCA
MGA_hup1	AGGCGGAATTCTAGTTTGTG	ATTATCGCTGAATGTACTGGAG
MGA_hup2	ATTTGTGCGAATCTACTGCA	AATGGCAGACGAACTAACC
MGA_ldh	CGATTACTGCTTCAATTCCAAC	CTTCAACAGAGTCAGAATTAACACC
MGA_ligA	CTTAGGGATGATCTCAGCAG	GTTACACCTCTAAGTTTCCCA
MGA_lon	TTGTTAAGATCTCACTTGGTGG	ATCCCTTCAACATAGTTAGCAG
MGA_lpd	AACTTGATCATTAACACCCGAC	CAATCATTAGTTGTGATCGGTG
MGA_manA	TTCTACCCCATTTTGAATACCG	CTAGTGAGTTAACTGTTTGGC

MGA_mraW	TCGAGTTATCAACTAGATCGAG	GGAAATATCTTCTTGCAGGATG
MGA_mscL	AACGTCATCTTAGTTTCAGCAC	CTTCAACACTTTGAGGTTCTGG
MGA_msrA	AAATCCGCTACGATACTGTG	TTATGCCAACTACAAACCAG
MGA_nei	GAACGTCATGTGTTAGTACGA	GCATAAATATTACCGATCCAG
MGA_nfo	ATTATGTTGTTCCACGCTCCT	ATCAGCCATTGTTTCAAGAC
MGA_osmC	AGCTAAAGTTGGTAGAGAAGGTC	ATTCTTTAGCCTTAGCTTCTGG
MGA_parC	AAACAACCCTAATCCCAAACC	CTTAAACTAATGCCAGGACCA
MGA_parE	CATGACTTCCACCTTCAGAG	CATTTATTGCCAAAGACGGGA
MGA_pfkA	GTGGTGATGGTTCATATCAAGG	AGATCTACGATCTCTTGGGTTG
MGA_pgi	CCAGAAGTAAAGATAACCAAAGCC	ATTATTCCCAACATACTCCGTG
MGA_pgk	CTAAAAACAGTCCAGAAGTAGG	TAAAGGTATTAACCATTCCCCC
MGA_pgm	GAGATCACTATTCAAGACAATGACAG	ACACCACCATCAAAAAAGAAGG
MGA_pgm-b	GCTGAACCTAATCAAGATCTGTG	AAACCCAATAGCTTGATCAGTG
MGA_potD	CAACTGCTTTATTAACTCTGACTC	CATTAACCCCTTCAAGACCAAC
MGA_prsA	CAGCATTTATTCTTCACTTCACC	CAGATTTACTAACCAAAGCAGG
MGA_ptsG_1	TGACGAAAATGGACAAAGAGTG	ATAGATTGGATTAGTGAAGGGTGG
MGA_ptsG_2	CCTTTGGTATTCTAAGACTAGTAGC	GGTTAATCTGTTTCAAGATAAACTGC
MGA_putA	CAAAAGCAGGTTATGAATATCGC	CTTTGATAATGGAGTGTTTAGGG
MGA_pykF	CCTTATTATGAAGTACCTTACTGGG	TCTGTCATTGGGAAATAGTGAG
MGA_recA	TGGTATGAGAATCAACTACCTG	GTAATCCCGAGGTTACAACCTG
MGA_recR	TAATTTGCTGTTGTTTGCCC	GTCAGGGTTGATCAAATCGT
MGA_rpiB	ATATTCGTAGCTGATCATACAGG	CAGTTATCATGTTGAATCGCAAG
MGA_rpoE	GGCTTCATTAATTGATAAGGCT	CCTTCATTGCTAATTTCAAGAGA
MGA_ruvA	TGCTTCAATCACGATCTCTG	GCACTGTTAACGATCAATGG
MGA_ruvB	TTGTGGGTGATAACGAATGG	AGCCAGAATAAAGCATTAGACC
MGA_spoT	TTATCATCTTCAGTAACCGCAC	GTGAAATGACATTCTTCTTGAGG
MGA_spxA	TCATGTATTGGCTGTACGAGAG	CCATCAATCTTTTAGGAATCCCTG
MGA_tig	GAAAACCCAGAAGTTAGCGTAG	CTCTAATTCGTAGTTTTTCGCC
MGA_tktA_1	AGAATACAAACAAAGCTCACGG	CACCTTCCCAAATAAATTACGG
MGA_tktA_2	AGATTACTGAAACGATCCTTGC	AAAGTTATCGATCTGATCTCGC
MGA_tpiA	TATTCGTACATTTGGCTTTGGC	CTGATCTTTAAGTACAGCTTTGGTC
MGA_tsf	AGTTAGCTGATCAAAAAGCAAC	TTAACAATAACTCCAATGCGGC
MGA_tuf	TCAAAATCGTCACTATGCACAC	TCTGATTACTGGAGTGTTATCACC
MGA_dinD	TATGAAGTGATCTATCGCAGGT	AGTGACGATCTTATCTGTTTGG
MGA_ung	TGATTAATTCTTCCCAACCCAG	GTAATCATTGGTCAAGATCCGT
MGA_uvrA	AAACCCTGCTTCACTTACTG	TTTCCACTACCAGAACTCC
MGA_uvrB	TGTGTTGTCGGAATTAACCT	ATCGCTTTAGTCATCTCATCAG
MGA_uvrC	TATGAAGTGATCTATCGCAGGT	AGTGACGATCTTATCTGTTTGG
MGA_uvrD	GTGTTGTAAGTTATGGTCCGA	CAGTGGTTTGACGATCATAGG

Таблица 9. Праймеры для количественной ПЦР кДНК *M. gallisepticum*.

8.3. Измерение представленности белков *M. gallisepticum*

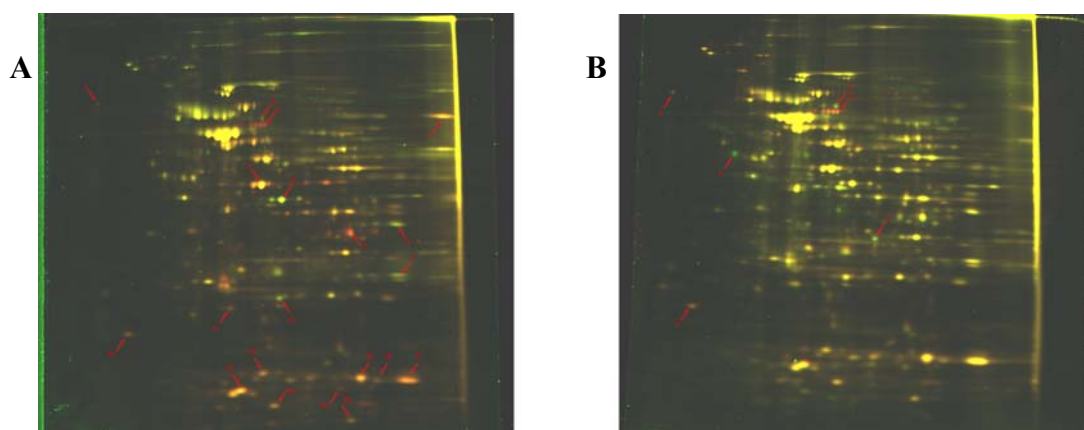


Рисунок 1. Двумерный электрофорез белков *M. gallisepticum* при тепловом стрессе в логарифмической (А) и стационарной (В) фазах. Окраска цианинами, красный цвет – образец теплового стресса, зелёный – контрольный образец. Стрелками отмечены идентифицированные белки, изменяющие представленность (см. Приложение, Таблицы 9 и 10). В стационарной фазе ответ существенно меньше по сравнению с логарифмической фазой.

№	Локус	Белок
		АВС-транспортёр спермидина/путресцина
1	GCW_02665	PotD
2	GCW_03690	Гипотетический белок
3	GCW_02755	НАДН-оксидаза
4	GCW_02785	Шаперон ClpB
5	GCW_01315	Фактор трансляции EF-Tu
6	GCW_03403	α -субъединица пируватдегидрогеназы E1
7	GCW_00475	Фактор трансляции EF-Ts
8	GCW_02745	β -субъединица пируватдегидрогеназы E1
9	GCW_03290	Триозо-фосфат изомераза
10	GCW_00325	δ -субъединица РНК-полимеразы
11	GCW_01270	АВС-транспортёр HatA
12	GCW_02495	Фосфолипид-связывающий белок
13	GCW_00790	Фактор созревания рибосом
14	GCW_00815	Гипотетический белок
15	GCW_03965	Гипотетический белок
16	GCW_01585	FeS-шаперон SufC
17	GCW_01635	Пероксиредоксин OsmC
18	GCW_03560	Тиоредоксин
19	GCW_00460	Тиоредоксин
20	GCW_02715	Шаперон GroES

Таблица 10. Аннотация белков для двумерного электрофореза – логарифмическая фаза.

№	Локус	Белок
		ABC-транспортёр спермидина/путресцина
1	GCW_02665	PotD
2	GCW_03690	Гипотетический белок
3	GCW_02755	НАДН-оксидаза
4	GCW_01315	Фактор трансляции EF-Tu
5	GCW_02750	α -субъединица пируватдегидрогеназы E1
6	GCW_03695	δ -субъединица РНК-полимеразы

Таблица 11. Аннотация белков для двумерного электрофореза – стационарная фаза.

Локус	Белок	RNA	2D-EF	MRM
GCW_02785	Шаперон ClpB	13,00	2,00	-
GCW_03075	Шаперон DnaK	3,50	-	1,50
GCW_02715	Шаперон GroES	0,27	1,30	-
MGA_0071	VlhA.1.05 Гемагглютинин семейства VlhA	-	-	0,35
MGA_0116	VlhA.2.01 Гемагглютинин семейства VlhA	-	-	0,23
MGA_0377	VlhA.3.0.1 Гемагглютинин семейства VlhA	-	-	0,51
	ABC-транспортёр спермидина/путресцина	0,46	1,60	-
GCW_02665	PotD			
GCW_03690	Гипотетический белок	0,58	0,79	-
GCW_02755	НАДН-оксидаза	0,57	7,40	-
GCW_01315	Фактор трансляции EF-Tu	0,47	1,60	-
GCW_02750	α -субъединица пируватдегидрогеназы E1	0,36	0,50	-
GCW_00475	Фактор трансляции EF-Ts	0,64	3,00	-
GCW_02745	β -субъединица пируватдегидрогеназы E1	0,41	0,59	-
GCW_03290	Триозо-фосфат изомераза	0,54	0,58	-
GCW_03695	δ -субъединица РНК-полимеразы	0,14	1,60	-
GCW_01270	ABC-транспортёр HatA	8,30	2,00	-
GCW_02495	Фосфолипид-связывающий белок	0,48	0,58	-
GCW_00790	Фактор созревания рибосом	1,40	1,30	-
GCW_00815	Гипотетический белок	1,00	1,40	-
GCW_03965	Гипотетический белок	6,80	1,30	-
GCW_01585	FeS-шаперон SufC	0,38	1,40	-
GCW_01635	Пероксиредоксин OsmC	0,41	2,00	-
GCW_03560	Тиоредоксин	0,48	1,30	-
GCW_00460	Тиоредоксин	1,70	2,00	-

Таблица 12. Белки *M. gallisepticum*, изменяющие представленность в ходе теплового стресса.