

УДК 577.29

# Адаптивные изменения профиля экспрессии генов *Mycobacterium avium* при заражении мышей, генетически чувствительных и резистентных к инфекции

Д. В. Игнатов<sup>1</sup>, Т. А. Скворцов<sup>1</sup>, К. Б. Майоров<sup>2</sup>, А. С. Апт<sup>2</sup>, Т. Л. Ажикина<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10<sup>2</sup>Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, 107564, Москва, Яузская аллея, 2

\*E-mail: tatazhik@ibch.ru

Поступила в редакцию 03.08.2010 г.

**РЕФЕРАТ** Проведено исследование транскриптомов *Mycobacterium avium* (штамм 724R) при инфекции мышей различных линий – генетически чувствительных и резистентных к этим бактериям. Определен набор генов *M. avium*, транскрибирующихся в легочной ткани мышей сравниваемых линий, и выявлены дифференциально транскрибирующиеся гены. Продемонстрировано, что при развитии инфекции в генетически восприимчивом организме повышена экспрессия ряда генов, отвечающих за восстановление NO, осуществление цикла Кребса и окислительного фосфорилирования, биосинтез жирных кислот, модификацию генома, репликацию и трансляцию. При развитии инфекции в резистентном организме повышена экспрессия ряда генов, отвечающих за изменение свойств клеточной поверхности, переход к анаэробному нитратному дыханию, деградацию жирных кислот, синтез полициклических производных жирных кислот, биосинтез микобактина и других поликетидов. По-видимому, при персистенции *M. avium* в резистентном организме наблюдается переход к хроническому состоянию, которое вызвано дефицитом двухвалентных ионов металлов и характеризуется переходом к анаэробному типу дыхания, получением энергии за счет деградации жирных кислот и изменением свойств клеточной стенки.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** *Mycobacterium avium*, анализ транскриптома *in vivo*, клонирование идентичных последовательностей (coincidence cloning), RNA-seq.

## ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные заболевания, вызываемые внутриклеточными патогенными бактериями, – одна из важных проблем современного мирового здравоохранения. Развитие инфекционного процесса зависит не только от защитных механизмов (природный и приобретенный иммунный ответ, барьерные функции слизистых), но и от специфической экспрессии бактериальных генов. Изменения в экспрессии, возникающие в ответ на защитную реакцию организма-хозяина, являются необходимым условием для выживания и функционирования патогенных бактерий. Анализ этих изменений необходим для понимания патогенеза инфекционного заболевания и выработки подходов к наиболее эффективному лечению.

*Mycobacterium avium* – это широко распространенные в окружающей среде микобактерии, которые

становятся внутриклеточными патогенами человека в отсутствие нормального Т-клеточного иммунитета [1, 2]. Они выявляются приблизительно у 70% пациентов со сформировавшимся неизлечимым СПИДом и считаются главной причиной смерти таких больных [3]. На фоне частично ослабленного иммунитета, например у пожилых людей и детей, *M. avium* может вызывать хронические заболевания легких [4–6]. При моделировании инфекции на мышах линии C57BL/6 (B6) и производных от нее линий, несущих нокаут-мутации существенных для иммунитета генов, было показано, что Т-клеточный иммунный ответ на *M. avium* играет как защитную, так и патогенетическую роль. Баланс между защитным иммунным ответом и патологическими процессами в легочной ткани при этой инфекции во многом напоминает патогенез туберкулеза [7–9], поэтому можно пред-

положить, что в основе заболеваний, вызываемых этими микобактериями, лежат не только сходные защитные механизмы иммунной системы, но и сходные механизмы преодоления этой защиты самими патогенами.

Ранее было показано, что мыши линий I/St (I/StSnEgYCit) и B6 сильно различаются по уровню резистентности к инфекции, вызываемой *M. avium* [10]. При респираторном заражении в легких мышей B6 развивается инфекция, приводящая к длительной инфильтрации ткани легкого макрофагами и нейтрофилами, развитию некротических легочных гранулем и гибели животных. При аналогичном заражении мышей I/St инфекция носит контролируемый характер, характеризуется умеренной инфильтрацией ткани легкого, появлением мелких и средних гранулем, не имеющих некротического центра, и не приводит к гибели животных. Было показано, что восприимчивость мышей линии B6 к инфекции, вызываемой *M. avium*, связана с тем, что в геноме мышей этой линии имеется нефункциональный аллель гена *Nramp1* (natural resistance-associated macrophage protein-1). Белок, кодируемый геном *Nramp1*, состоит из 12 трансмембранных доменов и экспрессируется на мембранах поздних лизосом и фагосом. Функционально *Nramp1* осуществляет транспорт двухвалентных катионов ( $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и др.) из фагосом, тем самым лишая микобактерии необходимых для их функционирования метаболитов [10].

Иммунный ответ у мышей B6 характеризуется повышенной продукцией IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и, особенно, IL-12. Мы предполагаем, что разный характер иммунного ответа на инфекции *M. avium* находит отражение в разном профиле экспрессии генов возбудителя в легких и лимфоидных органах у чувствительных и резистентных линий мышей – механизмы, необходимые при выживании в резистентном хозяине, могут не включаться при паразитировании в чувствительном.

С целью выявления особенностей биохимических процессов, связанных с адаптацией *M. avium* к генетически разным организмам-хозяевам, нами проведено сравнительное изучение последовательностей, транскрибирующихся при заражении мышей линий I/St и B6 на 13-й неделе развития инфекции.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стандартные процедуры работы с ДНК и РНК осуществлялись согласно [11]. Геномная ДНК *M. avium* штамма 724R была выделена согласно [12].

#### Инфицирование мышей

Мыши линий I/StSnEgYCit (I/St) и C57BL/6YCit (B6) выращивались в стандартных условиях в вива-

рии ЦНИИТ. Самок возраста 2.5–3.0 мес. подвергали аэрозольному заражению вирулентным штаммом 724R *M. avium*, охарактеризованным в [13]. Мышей инфицировали с помощью системы ингаляции (Glas-Col, США)  $1-2 \times 10^3$  колонийформирующих единиц *M. avium* как описано в [10].

#### Выделение РНК и синтез кДНК

РНК была выделена из легких мышей обеих линий через 13 недель с момента заражения с помощью набора реактивов RNA Isolation System (Promega, США). Образцы РНК были обработаны ДНКазой I (MBI Fermentas, Литва) для удаления следов ДНК. Первая цепь кДНК была построена с использованием олигонуклеотидных праймеров BR (5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(N)<sub>9</sub>) и SMART (5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCrGrGrG). Оба праймера (концентрация 12 мкМ) отжигали с 2 мкг тотальной РНК в растворе объемом 11 мкл. Смесь инкубировали 2 мин при 70°C, затем помещали в лед на 10 мин. Синтез кДНК осуществляли с помощью обратной транскриптазы PowerScript II (Clontech, США). Параллельно с реакцией обратной транскрипции (RT+) проводили контрольную реакцию (RT-) без добавления обратной транскриптазы. Реакционные смеси RT+ и RT- инкубировали при 37°C в течение 10 мин, затем 40 мин при 42°C. Для препаративного синтеза кДНК проводили 30 циклов ПЦР (95°C 20 с, 64°C 20 с и 72°C 2 мин) с использованием праймеров 5S (5' GTGGTATCAACGCAGAGT). кДНК очищали набором реактивов QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, США).

**Клонирование идентичных последовательностей (coincidence cloning)** проводили по методике, описанной в [14]. Геномную ДНК *M. avium* штамм 724R и образцы тотальных (т.е. синтезированных на матрицах тотальной РНК) кДНК фрагментировали рестриктазами RsaI и AluI. Полученные фрагменты геномной ДНК лигировали с супрессионными адаптерами 1A для гибридизации с образцом кДНК I/St и адаптерами 1B для гибридизации с образцом кДНК B6 (табл. 1). Фрагменты кДНК, полученные из легочной ткани мышей I/St и B6, лигировали с супрессионными адаптерами 2A и 2B соответственно. Смесь, содержащую 100 нг образца геномной ДНК и 100 нг одного из образцов кДНК в 2 мкл гибридизационного буфера (50 мМ HEPES, pH 8.3; 0.5 М NaCl; 0.02 мМ EDTA, pH 8.0), инкубировали при 99°C в течение 5 мин (денатурация), а затем при 68°C в течение 18 ч (ренатурация). Затем в реакционную смесь добавляли 100 мкл нагретого до 68°C гибридизационного буфера и 1 мкл полученного раствора использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР. Первый раунд ПЦР осуществляли в реакционном объеме

Таблица 1. Олигонуклеотиды и праймеры, использовавшиеся для клонирования идентичных последовательностей

	Название	Структура 5'-3'
Супрессионный адаптер 1А (получен отжигом эквимольной смеси олигонуклеотидов 1А long и 1А short)	1А long	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGСAGСGTGGТСGСGGССGAGAG
	1А short	СТСТСGGССG
Супрессионный адаптер 1В	1В long	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGСAGGGСGTGGТGСGGAGGGСGGС
	1В short	GССGGСССТСС
Супрессионный адаптер 2А	2А long	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGСAGGСaGGСGGТGGТGGGСA-GGС
	2А short	GССТGСССАС
Супрессионный адаптер 2В	2В long	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGСAGСGGAGGСGGТAGGAGGGС-GGA
	2В short	TССGССТССТ
Внешний праймер	T7	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGС
Внутренние праймеры	pr1А	AGСGTGGТСGСGGССGAGAG
	pr1В	AGGGСGTGGТGСGGAGGGСGGС
	pr2А	AGGСAGGСGGТGGТGGGСAGGС
	pr2В	AGСGGAGGСGGТAGGAGGСGGA

25 мкл, содержащем 10 пмоль праймера Т7. После преинкубации в течение 5 мин при 72°C (достройка липких концов) было проведено 20 циклов амплификации (94°C 30 с, 66°C 30 с, 72°C 90 с). Вторая стадия амплификации проводилась с 10 пмоль внутренних праймеров pr1А/pr1В и pr2А/pr2В и состояла из 25 циклов (94°C 30 с, 68°C 30 с, 72°C 90 с). В качестве матрицы использовали ПЦР-продукт 1-го раунда, разведенный в 10 раз. Амплификат очищали с помощью набора реактивов QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) и использовали для 454 секвенирования.

#### 454 секвенирование

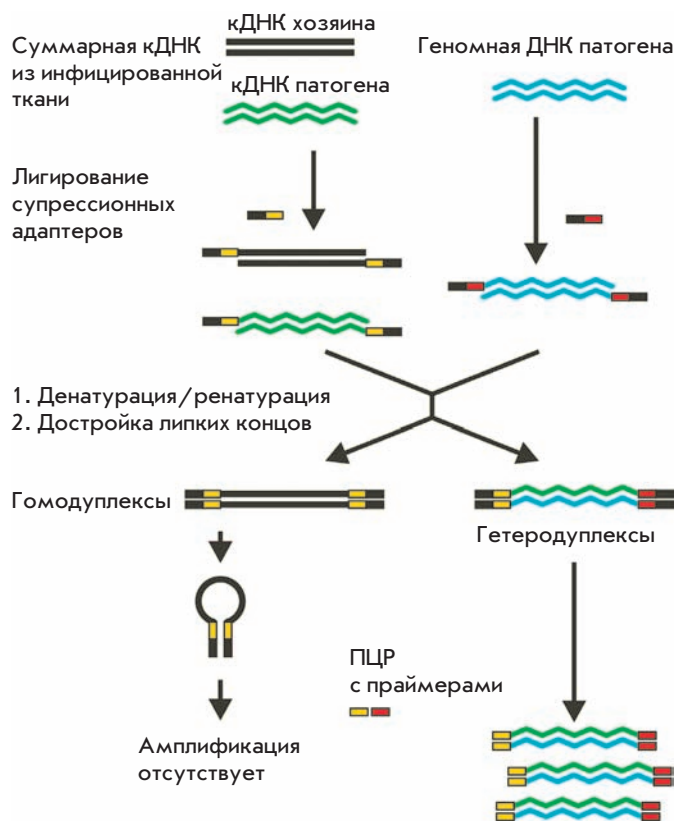
Нуклеотидные последовательности библиотек кДНК были определены массивным параллельным пиросеквенированием с помощью генетического анализатора GS FLX (Roche, Германия) и 20x75 см пикотитровальной плашки. Последовательности были прочитаны в 83 000 независимых реакциях. Картирование полученных последовательностей осуществлялось на последовательность генома *M. avium* штамма 104, так как геном *M. avium* 724R к настоящему моменту не секвенирован. Число фрагментов кДНК, соответствующих каждому гену, было определено с помощью алгоритма BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Последовательность признавалась принадлежащей определенному гену, если какой-либо фрагмент этой последовательности имел более чем 95% гомологию с сегментом гена длиной более 40 нуклеотидов. Поиск генов *M. avium*, разница в экс-

прессии которых в образцах I/St и В6 статистически достоверна, осуществляли согласно [15].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности патологии и развития иммунного ответа при заражении *M. avium* чувствительной (В6) и резистентной (I/St) линий мышей подробно описаны в [10, 16]. При аэрогенном способе заражения чувствительные мыши В6 погибали уже через 7 мес. после заражения, в то время как резистентные мыши I/St жили свыше 11 мес. Агрессивное течение инфекции у чувствительных мышей В6 характеризовалось быстрым развитием легочной патологии на фоне усиленной инфильтрации ткани легкого клетками иммунной системы и повышения продукции провоспалительных цитокинов IFN-γ, TNF-α, IL-6 и IL-12. Наблюдалась отчетливая корреляция двух параметров чувствительности к заражению: более быстрый рост *M. avium* в легких и большая выраженность легочной патологии у мышей чувствительной линии В6 по сравнению с резистентными мышами I/St.

Получение данных о последовательностях, транскрибирующихся *in vivo*, было проведено разработанным нами методом клонирования идентичных последовательностей [14, 17]. Для этого была выделена тотальная РНК из инфицированных легких мышей, которая представляет собой смесь мышинной и бактериальной РНК, при этом количество бактериальной РНК ничтожно мало, не более 0.1–0.2% [18]. Из образцов тотальной РНК I/St и В6 синтезирована тоталь-



**Рис. 1.** Клонирование идентичных последовательностей. К фрагментам геномной ДНК патогена и тотальной кДНК лигируют специфические олигонуклеотидные адаптеры. После совместной денатурации и ренатурации в смеси образуется два типа дуплексов. Благодаря эффекту супрессии ПЦР амплифицируются только гетеродуплексы, содержащие фрагменты кДНК и геномной ДНК патогена.

ная кДНК. Метод coincidence cloning, представленный на рис. 1, заключается в совместной денатурации и ренатурации фрагментированных суммарной кДНК и геномной ДНК *M. avium*. После проведения двух раундов селективной ПЦР-амплификации был получен набор фрагментов, обогащенный фрагментами бактериальной кДНК.

Для проведения качественного (определение нуклеотидных последовательностей специфически экспрессирующихся генов) и количественного (уровень их экспрессии) анализа полученных наборов был использован метод параллельного пиросеквенирования.

В результате секвенирования были получены две библиотеки последовательностей кДНК *M. avium*, экспрессирующихся в ткани легких при инфекции мышей I/St и B6. Был отобран ряд геномных локусов, повышенно экспрессирующихся в образце I/St по сравнению с образцом B6, и геномных локусов, по-

**Таблица 2.** Гены *M. avium*, дифференциально транскрибирующиеся в легких инфицированных мышей линий I/St и B6

Ген	Кодируемый белок
Повышенная экспрессия в легких мышей I/St	
MAV_2015	MbtG; лизин-N-оксигеназа микобактерии
MAV_1696	Глутаматдегидрогеназа
MAV_1304	NarH; нитратредуктаза, β-субъединица
MAV_2379	MetH; витамин B <sub>12</sub> -зависимая метионинсинтаза
MAV_2385	Белок семейства Mse
MAV_2063	Белок семейства Mse
MAV_2386	Белок семейства Mse
MAV_0118	Белок семейства PPE
MAV_3109	RifB; поликетидсинтаза 7
MAV_0880	3-Кетостероид-δ-1-дегидрогеназа
MAV_3000	Ацил-СоА-синтетаза
MAV_4019	Предполагаемая ацил-СоА-дегидрогеназа
MAV_4679	Циклопропан-ЖК-синтаза 1
Повышенная экспрессия в легких мышей B6	
MAV_2514	Белок семейства PPE
MAV_2924	Белок семейства PPE
MAV_2926	Белок семейства PPE
MAV_2244	GlnA; глутаминсинтетаза
MAV_4011	NO-редуктаза, β-субъединица
MAV_1074	SucC; сукцинил-СоА-синтетаза, β-субъединица
MAV_3303	AscA; аконитат-гидратаза
MAV_1130	NADH-дегидрогеназа I, H-субъединица
MAV_4040	NADH-дегидрогеназа I, H-субъединица
MAV_1524	АТФ-синтаза F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> , δ-субъединица
MAV_5034	Транспозаза
MAV_1059	Транспозаза

вышенно экспрессирующихся в образце B6 по сравнению с I/St (табл. 2). Аннотация локусов проводилась с помощью базы данных KEGG ([www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg)). Мы предполагаем, что дифференциальная экспрессия какого-либо гена в сравниваемых образцах может являться адаптацией к условиям, в которых существует микроорганизм, поэтому продукты генов, обнаруженных нами, представляют интерес как потенциальные факторы вирулентности.



Была обнаружена дифференциальная экспрессия генов семейства PPE (*MAV\_0118*, *MAV\_2514*, *MAV\_2924* и *MAV\_2926*). Эти белки играют важную роль при развитии микобактериальной инфекции как с антигенной, так и с иммунологической точки зрения. Это кислые глицин-богатые белки, идентифицируемые по специфическим доменам Pro-Pro-Glu (семейство PPE) и Pro-Glu (семейство PE), часто содержащие полиморфные повторяющиеся последовательности (PGRSs) и множественные копии основных полиморфных тандемных повторов. Предполагается, что эти белки экспрессируются на клеточной поверхности, обуславливая антигенную вариабельность, вызывающую различные иммунные ответы в зависимости от того, какой тип PE/PPE белков экспрессируется на клеточной поверхности [19]. Ген *MAV\_0118* экспрессируется при персистенции в мышце резистентной линии, а *MAV\_2514*, *MAV\_2926* и *MAV\_2924* – восприимчивой. Так как механизм действия белков PPE неизвестен, этому трудно дать объяснение, но, возможно, экспрессия разных белков PPE связана с разным типом иммунного ответа.

Генный локус *MAV\_2244* повышенно экспрессируется в образце В6. Этот ген является ортологом гена *glnA1* *M. tuberculosis* и кодирует глутаминсинтетазу, ключевой фермент в ассимиляции азота. Показано, что этот фермент необходим для персистенции *M. tuberculosis* в макрофагах. Вероятно, при заражении мышей линии В6 *M. avium* оказывается в среде, ауксотрофной по L-глутамину [20]. Заслуживает упоминания генный локус *MAV\_4011*, кодирующий цитохром b-содержащую субъединицу NO-редуктазы. Этот фермент способен восстанавливать NO в N<sub>2</sub>O. В некоторых почвенных микроорганизмах этот фермент участвует в денитрификации. Однако в *M. avium* из мышей В6, восприимчивых к инфекции, денитрификация не происходит. Предполагается, что NO-редуктаза позволяет *M. avium* разлагать NO, выделяемый макрофагом в пространство эндосом, и избегать его разрушительного действия [21]. Вероятно, именно этим объясняется устойчивость *M. avium* к воздействию NO [22]. Экспрессию NO-редуктазы в *M. avium* из легких восприимчивой к инфекции мыши можно объяснить тем, что иммунный ответ в этом случае развивается сильнее, и повышается выработка NO макрофагами.

В образце В6 гораздо активнее и разнообразнее экспрессируются гены, кодирующие ферменты цикла Кребса: *MAV\_1074* и *MAV\_3303*, кодирующие сукцинил-СоА-синтетазу и аконитат-гидратазу соответственно; а также гены, кодирующие белки, необходимые для окислительного фосфорилирования, и белки дыхательной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ): *MAV\_1130*, *MAV\_4040* и *MAV\_1524*. Вероятно,

при персистенции в мышцах восприимчивой линии повышается уровень дыхания для обеспечения энергетических потребностей патогена. Ген локуса *MAV\_4040* кодирует одну из субъединиц NADH-дегидрогеназы I типа, что характерно для острой фазы инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*, и экспоненциального размножения патогена [23].

Экспрессия генов *MAV\_5034* и *MAV\_1059*, кодирующих транспозазы в образце В6, свидетельствует о повышенном уровне генетических перестроек. В этом же образце наблюдается повышенная экспрессия генов *MAV\_5024* и *MAV\_5027*, кодирующих ферменты рестрикции-модификации II типа, функция которых – защита от проникновения чужеродной ДНК в клетку.

Повышенная экспрессия генов *MAV\_0382* (субъединицы ДНК-полимеразы III) и *MAV\_4450* (белок рибосомы) в образце В6 свидетельствует о повышении уровня репликации ДНК, связанном с большей частотой деления клеток, и повышении уровня трансляции.

В образце I/St наблюдается очень высокий уровень экспрессии гена *MAV\_2015*, кодирующего фермент микобактин-лизин-N-оксигеназу (MbtG). Этот фермент осуществляет одну из последних стадий синтеза микобактина, хелатирующего железо агента, позволяющего микроорганизму добывать железо из окружающей среды [24]. Для *M. tuberculosis* показано, что активация транскрипции кластера генов *mbt B-H*, участвующих в синтезе микобактина, происходит либо при недостатке железа в окружающей среде [25], либо при попадании в анаэробную среду обитания [26]. Этот ген высоко экспрессируется в *M. avium* из резистентной линии мышей I/St, но практически не экспрессируется в В6. Как уже упоминалось, эти линии мышей отличаются аллелем гена *Nramp1*, кодирующего ионный насос, предположительно выкачивающий двухвалентные катионы из пространства эндосом, в которых находится *M. avium* [16]. Мыши линии I/St имеют функциональный аллель этого гена, а линии В6 – нефункциональный. По-видимому, в эндосоме *M. avium* из резистентной мыши наблюдается дефицит железа, и микроорганизм вынужден синтезировать огромное количество молекул микобактина, чтобы восполнить его недостаток.

В *M. avium* из мышей I/St наблюдается повышенная экспрессия гена *MAV\_1696*, кодирующего NAD<sup>+</sup>-зависимую глутаматдегидрогеназу. Считается, что, в отличие от NADP<sup>+</sup>-зависимой глутаматдегидрогеназы, осуществляющей ассимиляцию азота, у микроорганизмов этот фермент участвует в катаболизме глутамата, и экспрессия этого гена не зависит от концентрации NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Однако недавно у *M. smeg-*

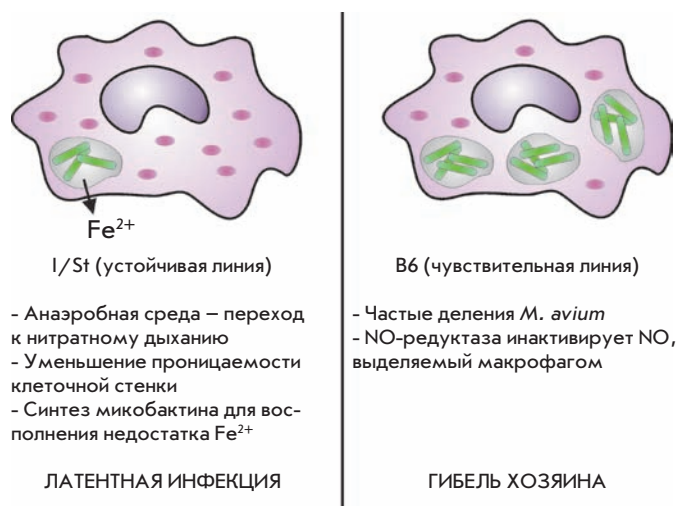


Рис. 2. Метаболическое состояние микобактерий в макрофагах мышей различных линий.

*matis* было показано повышение экспрессии гена *msmeg\_4699*, ортоголичного *MAV\_1696*, возникающее в ответ на дефицит  $\text{NH}_4^+$  в окружающей среде [27]. Кроме того, в геноме *M. avium* отсутствует ген, кодирующий  $\text{NADP}^+$ -зависимую глутаматдегидрогеназу [28]. Существует предположение, что у микобактерий  $\text{NAD}^+$ -зависимая глутаматдегидрогеназа может играть роль в ассимилировании азота с гораздо меньшими энергетическими затратами, чем с помощью GS/GOGAT-пути, что необходимо, например, при латентном состоянии патогена [27].

Ген *MAV\_2379*, кодирующий  $\text{B}_{12}$ -зависимую метионинсинтазу *MetH*, повышено экспрессируется в *M. avium* из мыши I/St. Этот белок участвует в заключительной стадии синтеза метионина. В геноме *M. avium* эту же реакцию осуществляет *MetE-B<sub>12</sub>*-независимая метионинсинтаза, экспрессия которой при наличии в среде витамина  $\text{B}_{12}$  подавлена [29]. Регуляция экспрессии гена *metH* не изучена, и повышение его экспрессии в резистентной мыши не совсем понятно.

Ген локуса *MAV\_1304*, кодирующий  $\beta$ -субъединицу нитратредуктазы, представляет особый интерес. Этот ген является ортоголом гена *narH* *M. tuberculosis*. Продуктом этого гена является одна из субъединиц анаэробной нитрат-редуктазы *NarGHJI*, фермента, позволяющего осуществлять нитратное дыхание в отсутствие кислорода. Мутанты, лишённые *NarH*, утрачивают способность восстанавливать азот в анаэробных условиях [30]. При делеции этого гена в *M. bovis* BCG бактерии нормально росли *in vitro* при достаточном уровне кислорода, но показывали крайне ослабленную вирулентность при заражении мышей [31]. Экспрессия гена *MAV\_1304* в *M. avium* в легких

I/St может свидетельствовать о том, что в результате негативного воздействия защитных систем хозяина микроорганизм оказывается в анаэробных условиях и вынужден переходить на нитратное дыхание.

Гены локусов *MAV\_2063*, *MAV\_2385* и *MAV\_2386*, кодирующие белки семейства *Mse*, экспрессируются при заражении резистентной линии мышей. Функция белков *Mse* не установлена экспериментально, но известно, что они обеспечивают свойства инвазивности. Предполагается, что эти белки представляют собой новую группу ABC-транспортёров, участвующих в ремоделировании клеточной мембраны [32].

Генный локус *MAV\_4679*, кодирующий фермент, участвующий в синтезе миколовых кислот, повышено экспрессируется в *M. avium* из мышей I/St. Ортолог этого гена у *M. tuberculosis* необходим для персистенции в легких мышей. Мутанты по этому гену не способны вызывать легочную инфекцию у мышей [33].

Генный локус *MAV\_3109* кодирует белок *RifB* и является ортологом гена *pks7* *M. tuberculosis*. Повышенная экспрессия этого гена наблюдается при инфицировании мыши устойчивой линии. Белковый продукт этого гена кодирует один из ферментов, участвующих в синтезе фтиоцеролдимикоцерозата, одного из компонентов клеточной микобактериальной стенки, обеспечивающий ее непроницаемость [34].

Ген локуса *MAV\_0880* кодирует 3-кетостероид- $\delta$ -1-дегидрогеназу, один из ферментов, осуществляющих катаболизм холестерина. При инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*, холестерин служит источником энергии для патогена при персистенции в макрофагах [35]. В *M. avium* из мыши I/St отмечена повышенная экспрессия генов *MAV\_3000* и *MAV\_4019*, кодирующих ферменты деградации жирных кислот: ацил-*CoA*-дегидрогеназу и ацил-*CoA*-синтетазу. Известно, что при персистенции в макрофагах катаболизм жирных кислот становится основным источником энергии для *M. tuberculosis* [36].

## ВЫВОДЫ

Представленная работа является первым описанием транскриптома *M. avium* в условиях инфекции *in vivo*. К настоящему моменту имеется лишь одна публикация, описывающая транскрипционный ответ *M. avium paratuberculosis* на воздействие различных факторов *in vitro* [37].

Мы использовали модель генетического контроля чувствительности к инфекции *M. avium* и тяжести заболевания у мышей для поиска последовательностей, дифференциально транскрибирующихся при заражении генетически резистентных и генетически чувствительных линий мышей, т.е. при пер-

систировании патогена в условиях генетически различного микроокружения. Нами получены сведения о качественных и количественных различиях в профилях транскрипции генов бактерии при персистенции в резистентной и восприимчивой к инфекции линиях мышей, указывающие на изменения в метаболизме *M. avium* (рис. 2).

При развитии инфекции в генетически восприимчивом организме (линия В6) отмечена повышенная экспрессия ряда генов, отвечающих за ассимиляцию азота, восстановление NO, осуществление цикла Кребса и окислительного фосфорилирования, репликацию и трансляцию. Инфекция характеризуется активным делением микобактерии и гибелью организма хозяина.

При развитии инфекции в резистентном организме (линия I/St) отмечена повышенная экспрессия ряда генов, отвечающих за изменение свойств клеточной

поверхности, переход к анаэробному нитратному дыханию, деградацию жирных кислот, синтез полициклических производных жирных кислот, биосинтез микобактина и других поликетидов. В целом, изменения метаболизма *M. avium* свидетельствуют о том, что в организме мыши устойчивой линии наблюдается переход бактериального патогена к латентному состоянию, вызванный дефицитом ионов двухвалентных металлов. ●

*Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-01053), Программой поддержки ведущих научных школ России (проект НШ-5638.2010.4), Программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН, а также грантом Национального института здоровья США (НИH; grant no.AI078864, А.С. Ант).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Horsburgh C.R., Jr. // *N. Engl. J. Med.* 1991. V. 324. P. 1332-1338.
- Inderlied C.B., Kemper C.A., Bermudez L.E. // *Clin. Microbiol. Rev.* 1993. V. 6. P. 266-310.
- Nightingale S.D., Byrd L.T., Southern P.M., et al. // *J. Infect. Dis.* 1992. V. 165. P. 1082-1085.
- Benson C.A. // *Clin. Infect. Dis.* 1994. V. 18. Suppl 3. P. S218-222.
- Griffith D.E. // *Curr. Opin. Pulm. Med.* 1997. V. 3. P. 139-145.
- Nolt D., Michaels M.G., Wald E.R. // *Pediatrics.* 2003. V. 112. P. e434.
- Benini J., Ehlers E.M., Ehlers S. // *J. Pathol.* 1999. V. 189. P. 127-137.
- Rook G.A., Hernandez-Pando R. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1996. V. 50. P. 259-284.
- Schluger N.W., Rom W.N. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998. V. 157. P. 679-691.
- Kondratieva E.V., Evstifeev V.V., Kondratieva T.K., et al. // *Infect. Immun.* 2007. V. 75. P. 4762-4768.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Torrea G., Levee G., Grimont P., et al. // *J. Clin. Microbiol.* 1995. V. 33. P. 1899-1904.
- Pedrosa J., Florido M., Kunze Z.M., et al. // *Clin. Exp. Immunol.* 1994. V. 98. P. 210-216.
- Azhikina T., Skvortsov T., Radaeva T., et al. // *Biotechniques.* 2010. V. 48. P. 139-144.
- Audic S., Claverie J. // *Genome Research.* 1997. V. 7. P. 986.
- Kondratieva E., Logunova N., Majorov K., et al. // *PLoS One.* 2010. V. 5. P. e10515.
- Skvortsov T., Azhikina T. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. V. 36. P. 550-559.
- Banaiee N., Jacobs W.R., Jr., Ernst J.D. // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. P. 6449-6457.
- Ramakrishnan L., Federspiel N.A., Falkow S. // *Science.* 2000. V. 288. P. 1436-1439.
- Tullius M.V., Harth G., Horwitz M.A. // *Infect. Immun.* 2003. V. 71. P. 3927-3936.
- Hendriks J., Oubrie A., Castresana J., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1459. P. 266-273.
- Appelberg R. // *Immunol. Research.* 2006. V. 35. P. 179-190.
- Shi L., Sohaskey C.D., Kana B.D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 15629-15634.
- Ratledge C. // *Tuberculosis.* 2004. V. 84. P. 110-130.
- Gold B., Rodriguez G.M., Marras S.A.E., et al. // *Molecular Microbiology.* 2001. V. 42. P. 851-865.
- Bacon J., James B.W., Wernisch L., et al. // *Tuberculosis.* 2004. V. 84. P. 205-217.
- Harper C., Hayward D., Kidd M., et al. // *BMC Microbiology.* 2010. V. 10. P. 138.
- Amon J., Titgemeyer F., Burkovski A. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 17. P. 20-29.
- Warner D.F., Savvi S., Mizrahi V., Dawes S.S. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. P. 3655-3659.
- Malm S., Tiffert Y., Micklinghoff J., et al. // *Microbiology.* 2009. V. 155. P. 1332-1339.
- Weber I., Fritz C., Ruttkowski S., et al. // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 35. P. 1017-1025.
- Casali N., White A.M., Riley L.W. // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 441-449.
- Glickman M.S., Cox J.S., Jacobs W.R. // *Mol. Cell.* 2000. V. 5. P. 717-727.
- Waddell S.J., Chung G.A., Gibson K.J., et al. // *Letts. Appl. Microbiol.* 2005. V. 40. P. 201-206.
- van der Geize R., Yam K., Heuser T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 1947-1952.
- Muñoz-Elías E., McKinney J. // *Nature Medicine.* 2005. V. 11. P. 638-644.
- Wu C.W., Schmoller S.K., Shin S.J., Talaat A.M. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. P. 7877-7886.