

УДК 577.29

# Протеомные подходы в изучении микобактерий

Ю. А. Беспятых\*, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, 119435, Москва, Малая Пироговская, 1а

\*E-mail: JuliaBespyatykh@gmail.com

Поступила в редакцию 17.03.2016

Принята к печати 10.10.2016

**РЕФЕРАТ** Физиология возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* интенсивно изучается, однако накопленные к настоящему времени геномные и транскриптомные данные не позволяют в полной мере понять патогенный потенциал этих бактерий. В связи с этим актуальным представляется сравнительное изучение протеома микобактерий, отражающего закодированную в геноме информацию. В представленном обзоре рассмотрены основные этапы становления методов протеомного анализа, применяемых для изучения микобактерий, в аспекте повышения информативности и точности измерений. Описаны основные достижения в изучении протеома *M. tuberculosis* в целом. Отдельное внимание уделено наиболее распространенному на территории России семейству штаммов Beijing и особенностям его протеома. Принимая во внимание, что протеом описывает всю совокупность белков в клетке, рассмотрены также посттрансляционные модификации белков микобактерий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** белки, *Mycobacterium tuberculosis*, протеом, протеомика, туберкулез.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** MS – масс-спектрометрия; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ММР – мониторинг множественных реакций; ПТМ – посттрансляционные модификации; ОРС – открытые рамки считывания; ТФ – фактор транскрипции.

## ВВЕДЕНИЕ

Системная биология прокариот стремится к пониманию того, каким образом физико-химические свойства и характер взаимодействия биомолекул связаны с формированием фенотипических свойств микроорганизмов. Нуклеотидную последовательность прокариотического генома в настоящее время можно расшифровать в течение нескольких часов. Тем не менее, несмотря на то, что геном прямо или косвенно кодирует основные биомолекулы клетки, такие, как РНК и белки, описать особенности их функционирования, только опираясь на информацию о геномной последовательности, невозможно. Для исследования структуры, функций и механизмов регуляции таких молекулярных систем необходимы точные и воспроизводимые методы количественного измерения всех компонентов в различных состояниях. Сегодня такие измерения стали обычными для РНК [1–4], однако из-за технических ограничений на уровне белка они пока отстают в чувствительности и репрезентативности.

Наиболее интенсивно методами системной биологии изучают клинически значимые микроорганизмы, в частности микобактерии. На сегодняшний день описано 213 видов микобактерий, многие из ко-

торых ассоциированы с инфекционными процессами у человека или животных [5]. К ним относятся *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* и *M. ulcerans*, вызывающие туберкулез, лепру (проказу) и язву Бурули соответственно. Согласно международной статистике, возбудителем туберкулеза инфицирована примерно треть населения Земли, при этом в 2015 году зарегистрировано около 1.3 миллиона смертельных исходов от этой инфекции [6]. Не удивительно, что наибольший интерес вызывают особенности физиологии и молекулярной организации *M. tuberculosis*.

До недавнего времени основные усилия были сосредоточены на изучении особенностей геномной организации возбудителя туберкулеза. Сегодня доступны данные геномного секвенирования более 10000 штаммов *M. tuberculosis* с различными фенотипами и генотипами. Однако опыт применения технологии полногеномного секвенирования с последующим сравнительным анализом выявляет ограниченную пригодность такого подхода для полноценного описания причин развития лекарственной устойчивости и проявления патогенности [7]. Так, большинство точечных мутаций, отличающих группы штаммов, обнаружены в промоторных обла-

стях генов и/или участках, кодирующих белки с гипотетической функцией, роль которых в физиологии микобактерий неясна. В этой связи актуальным становится функциональный анализ информации, реализуемой геномом патогена, проводимый с привлечением методов протеомного тестирования, в том числе количественной протеомики.

Стоит отметить, что на сегодняшний день выделение ДНК и РНК микобактерий и дальнейшие манипуляции с ними регламентированы достаточно большим количеством протоколов [8–10], которые применяются в различных лабораториях [11–16]. Иначе обстоят дела с выделением белков, особенно полной белковой фракции, необходимой для получения протеома. Особенности организации клеточной стенки, устойчивой к воздействию факторов внешней среды, в том числе к действию кислоты и щелочи, делают *M. tuberculosis* достаточно сложным объектом для протеомного анализа. Последнее в свою очередь требует отработки уникальных условий экстракции белков. Реализуемые протоколы протеомного анализа *M. tuberculosis* должны быть также достаточно эффективными, учитывая сложность накопления значительной бактериальной массы из-за крайне медленного роста культуры.

В данном обзоре рассмотрено развитие средств протеомного анализа микобактерий в хронологическом аспекте повышения их информативности и точности измерений.

## ПРОТЕОМНЫЕ ПОДХОДЫ В ИЗУЧЕНИИ МИКОБАКТЕРИЙ

### Развитие методов протеомного анализа микобактерий

Марк Уилкинс в 1986 году впервые ввел термин «протеом», объединив два слова: «белок» (англ. PROTein) и «геном» (англ. genOME) [17]. Протеом – это совокупность белков в клетке, включая их изменения, происходящие со временем или под действием каких-либо факторов. В 1997 году по аналогии с геномикой, изучающей гены и их функции [18], появился термин «протеомика».

Протеомика исследует совокупность белков, синтезируемых организмом/клеткой в данной среде и на конкретном этапе клеточного цикла. Она описывает качественный состав белков, их относительную представленность, взаимодействие с другими макромолекулами, а также посттрансляционные модификации (ПТМ) [19–21].

Протеомика все еще отстает от геномики и транскриптомики из-за инструментальных проблем и недостаточной чувствительности существующих методов, однако появляется все больше работ, в которых

протеомные методы использовали для изучения инфекционных агентов.

Стоит отметить, что наиболее весомый вклад в развитие протеомики микобактерий внесли работы группы R. Aebersold [22, 23]. Основные работы по изучению белков микобактерий представлены в *таблице*.

Ранние исследования в области протеомики *M. tuberculosis*, выполненные в конце прошлого века, опирались на стратегию так называемой «нисходящей» (top down) протеомики, в основе которой лежит первичная сортировка интактных белков, выделенных из биологического образца, согласно их физико-химическим свойствам (с использованием гель-электрофореза, гель-фильтрации) с последующей идентификацией их масс-спектрометрическими (МС) методами (*рис. 1*). При таком подходе удавалось идентифицировать и квантифицировать около 100 белков микобактерий [24], что не превышает 3% общего протеома *M. tuberculosis*.

Дальнейшее развитие средств протеомного анализа открыло новые пути изучения туберкулеза, облегчив исследование многих сложных вопросов, в том числе и взаимодействий бактерии с клеткой хозяина. Для получения полного протеома наиболее эффективными считаются технологии, реализующие стратегию так называемой «восходящей» (bottom up) протеомики [20, 21], основанной на том, что общую массу белков, изолированных из биологического объекта, сначала протеолитически расщепляют на пептиды, которые затем непрерывным потоком анализируют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС, от англ. liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry) (*рис. 1*). Все разнообразие «восходящих» методик на уровне МС-эксперимента можно разделить на (1) исследовательские или панорамные (shotgun-proteomics) и (2) подтверждающие (таргетные, целевые) (*рис. 2*). Первые предназначены для идентификации и количественного анализа как можно большего числа белков и позволяют описать до 1000 белков *M. tuberculosis* за один запуск МС [25]. Вторые созданы для отслеживания во множестве образцов сравнительно небольшого, определенного до начала эксперимента, набора белков/пептидов с наивысшей доступной чувствительностью, точностью, воспроизводимостью и пропускной способностью метода (например, мониторинг множественных реакций (ММР), от англ. Multiple Reaction Monitoring).

Стоит отметить, что при реализации панорамного подхода наиболее точные результаты количественного сопоставления образцов достигаются при изотопном мечении одного из аналитов [38]. В частности, метод изотопного мечения белков в культуре клеток

Основные работы, внесшие вклад в развитие протеомики микобактерий

Год	Название работы	Количество идентифицированных белков	Источник
1997	Definition of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry	32	Sonnenberg M.G., and Belisle J.T. [26]
1999	Comparative proteome analysis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and <i>Mycobacterium bovis</i> BCG strains: toward functional genomics of microbial pathogens	107	Jungblut P.R. <i>et al.</i> [27]
2000	Toward the proteome of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	167	Rosenkrands I. <i>et al.</i> [24]
2003	Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strain	739	Gu S. <i>et al.</i> [28]
2004	Complementary analysis of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> proteome by two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tag technology	361	Schmidt F. <i>et al.</i> [29]
2005	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> functional network analysis by global subcellular protein profiling	1044	Mawuenyega K.G. <i>et al.</i> [30]
2010	Using a label-free proteomics method to identify differentially abundant proteins in closely related hypo- and hypervirulent clinical <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Beijing isolates	1668	de Souza G.A. <i>et al.</i> [31]
2011	Comparison of membrane proteins of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv and H37Ra strains	1578	Malen H. <i>et al.</i> [32]
2011	Characterization of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> proteome by liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics techniques: a comprehensive resource for tuberculosis research	1051	Bell C. <i>et al.</i> [33]
2011	Proteogenomic analysis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> by high resolution mass spectrometry	3176	Kelkar D.S. <i>et al.</i> [34]
2013	The Mtb Proteome Library: A resource of assays to quantify the complete proteome of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3894	Schubert O.T. <i>et al.</i> [23]
2014	Disclosure of selective advantages in the “modern” sublineage of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Beijing genotype family by quantitative proteomics	2392	de Keijzer J. <i>et al.</i> [35]
2015	Quantitative proteomic analysis of <i>M. tuberculosis</i> cluster Beijing B0/W148 strains	1868	Bespyatykh J. <i>et al.</i> [36, 37]

(от англ. Stable Isotope Labeling by Amino acids in cell Culture, SILAC) основан на встраивании в структуру белка незаменимых аминокислот, содержащих стабильные изотопы (обычно <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N аргинин и/или лизин) [39, 40]. Подразумевается, что анализируемые клетки не должны синтезировать лизин и аргинин самостоятельно и использовать исключительно находящиеся в среде меченые аминокислоты. Однако *M. tuberculosis* обладает способностью синтезировать лизин эндогенно, что сразу ограничивает возможности данного подхода. В последнее время основной акцент в количественной протеомике микобактерий сделан на использовании безметочных методов MS

квантификации белков, обладающих большей чувствительностью и производительностью [31, 41].

Новые подходы к накоплению и обработке масс-спектров, например SWATH™ от компании ABSciEX, совмещают панорамные (data-independent acquisition, DIA) и подтверждающие (data-dependent acquisition, DDA) методики с целью минимизировать ограничения каждой из них [42]. При этом для SWATH™ не требуется отбор единичных родительских ионов, а ионы прекурсоры пропускаются большими окнами (к примеру, в 25 Да). Таким образом, SWATH™ позволяет идентифицировать и квантифицировать большой набор белков, подобно классическим панорам-



Рис. 1. Основные протеомные подходы «нисходящей» и «восходящей» протеомики. Адаптировано из [118] с модификациями

\* МАЛДИ МС – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, совмещенная с масс-спектрометрией.

ным подходам, но с точностью и воспроизводимостью ММП для большего числа образцов.

### ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОМА ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП МИКОБАКТЕРИЙ

#### Протеомная характеристика штамма *M. tuberculosis* H37Rv

На сегодняшний день *M. tuberculosis* H37Rv является наиболее хорошо изученным штаммом микобактерий. Отметим, что геномная последовательность этого штамма была полностью расшифрована еще в 1998 году [43]. Закономерно, что протеом этого штамма также изучен максимально полно. К настоящему моменту с использованием комплексных протеомных подходов подтверждено существование 97% белков из 4012 аннотированных на основании геномной последовательности [23]. Описаны пулы мембранных белков и клеточной стенки [32, 44], цитозольные бел-

ки [25, 30, 45], секретируемые белки, определяемые в культуральном фильтрате [46].

Анализ белков регулона DosR, ассоциированного с анаэробным выживанием *M. tuberculosis*, позволил выявить изменения их представленности в бактериальной культуре штамма H37Rv, помещенного в условия гипоксии [29]. В частности, при гипоксии представленность белка HspX увеличивалась в 340 раз по сравнению с культурой, находящейся в нормальных условиях. Стоит отметить, что до этого данный регулон изучали исключительно на уровне транскриптов [47, 48].

Отдельно стоит упомянуть исследования, в которых моделировали инфекционный процесс и оценивали белковый профиль *M. tuberculosis* в условиях, максимально приближенных к существованию бактериальных клеток в живом организме. В работе Cho и соавт. [49] проведен сравнительный протеомный анализ белков латентной формы штамма H37Rv в экспоненци-

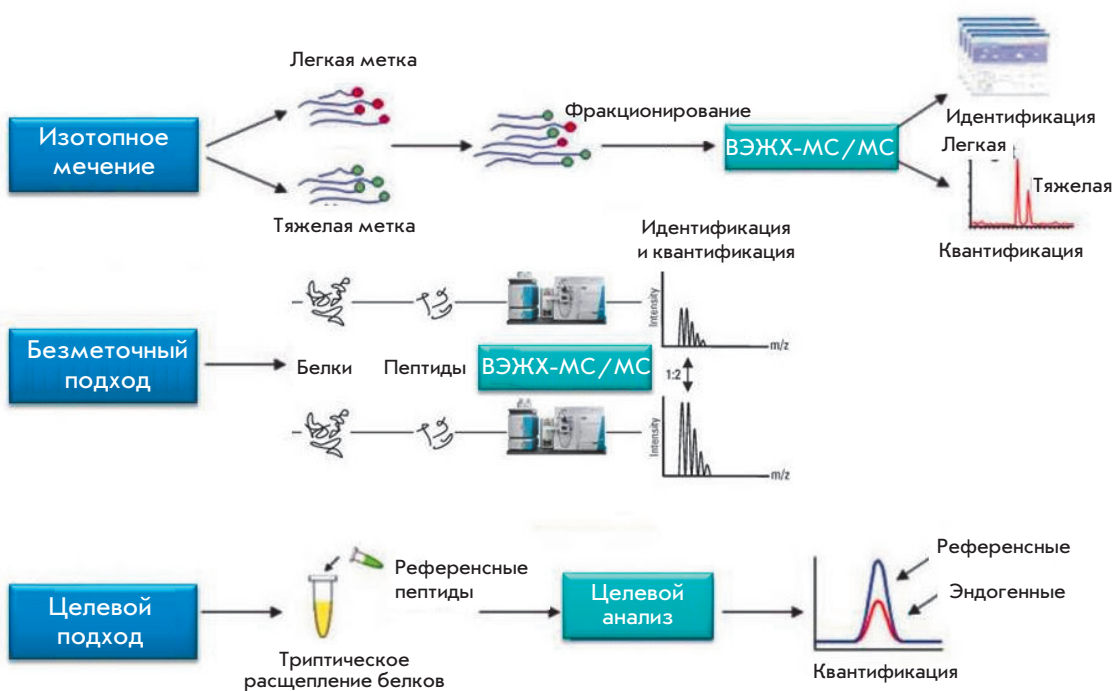


Рис. 2. Методы протеомного анализа, реализующие «восходящие» подходы

альной, логарифмической и стационарной фазах роста с использованием технологии сайт-специфического мечения остатков цистеина (от англ. isotope-coded affinity tags, ICAT), основанной на ковалентном мечении остатка цистеина в полипептидной цепи химически идентичными, но изотопно разными реагентами [22, 29]. По результатам были описаны высокопредставленные белки, характерные для экспоненциальной и стационарной фазы – 193 и 241 соответственно. Большинство этих белков относилось к системам деградации и энергетическому метаболизму.

С целью изучения факторов вирулентности *M. tuberculosis* и поиска потенциальных кандидатов для разработки вакцин оценивали различия в протеомных профилях вирулентного штамма H37Rv и авирулентных микобактерий (*M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* BCG). Выявлена одинаковая представленность большинства мембранных белков в штаммах H37Rv и H37Ra, тогда как представленность 121 белка в этих штаммах различается более чем в 5 раз. Дальнейшее изучение мембранных липопротеинов и данные о регуляции этих белков позволили предположить, что изменение метаболического состояния может играть роль в повышенной вирулентности [32]. Изучение белков системы Esat-6 и ESAT-6-подобных белков, которые обнаруживаются только в штаммах H37Rv, но не в H37Ra, выявило мутации в генах пяти ESAT-6-подобных белков в штамме H37Ra. Стоит отметить, что антиген 6 кДа (Esat-6) образует гетеродимерный комплекс с белком CFP-10 [50]. Таким образом, предпо-

лагают, что система ESAT-6/CFP-10 ассоциирована с вирулентностью *M. tuberculosis* и препятствует слиянию фагосомы и лизосомы внутри макрофагов хозяина, тем самым предотвращая разрушение клеток микобактерий [51].

Несмотря на то что H37Rv и *M. bovis* BCG на геномном уровне имеют более 99.9% гомологии, выявлено 294 белка, статистически отличающихся между двумя штаммами [41]. Ранее при помощи сравнительного геномного анализа этих штаммов обнаружили отсутствие определенных регионов различия (от англ. Regions of difference, RD) в геноме BCG, и с потерей соответствующих генов было связано отсутствие патогенности [52]. Таким образом, ряд различающихся белков соответствовал описанным RD [41, 53, 54]. Среди них особое внимание было уделено системе ESAT-6, белки которой ранее предложили в качестве кандидатов для разработки новой вакцины [55]. Дополнительно для разработки диагностических и вакцинных препаратов предложены 22 дифференциально экспрессирующихся белка, таких, как ацетил-СоА ацетилтрансфераза (Rv0243) и некоторые Esat-6-подобные белки (Rv1198, Rv1793) [54].

### Протеомная характеристика семейства штаммов Beijing *M. tuberculosis*

Как уже отмечалось выше, большинство работ посвящено изучению протеома лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv и лишь в небольшом количестве приведены протеомные характеристики других генетических семейств.

Согласно современной классификации штаммы *M. tuberculosis* делят на семь генетических линий [56]. С клинической точки зрения несомненный интерес представляет семейство Beijing. Штаммы данного семейства относятся к филогенетической линии 2 и представлены в наибольшем количестве стран на глобальном уровне: 13% от мирового количества изолятов [57]. Также для них характерна ассоциация с формированием лекарственной устойчивости [58] и большая, чем у других семейств, вирулентность [59].

Сравнение протеомов штаммов Beijing и H37Rv выявило существенные различия между ними. В штаммах Beijing представленность белков Rv0129c, Rv0831c, Rv1096, Rv3117 и Rv3804c, относящихся к известным факторам вирулентности [60], была выше, чем в H37Rv, а содержание белков Hsp65 (Rv0440), Pst1 (Rv0934) и Rv1886c – основных антигенов, снижение выработки которых может способствовать уходу микобактерий от иммунного ответа хозяина [61, 62], было уменьшено. Кроме того, белки эффлюксных помп Rv0341, Rv2688c и Rv3728 найдены исключительно в штаммах Beijing [35].

Однако нам известны только две работы [31, 35], в которых изучали белковое разнообразие штаммов Beijing. В первой из них de Souza и соавт. сравнили протеомы гипо- и гипервирулентных штаммов данного семейства и описали около 50 белков, высокопредставленных в каждой группе, при том, что всего идентифицировано 1668 белков [31]. Показано, что в гипервирулентных штаммах представленность белка ESAT-6 ниже, чем в гиповирулентных, причем этот результат дополнительно подтвержден сравнительной оценкой экспрессии соответствующего гена на уровне РНК-транскриптов. Стоит отметить, что увеличение относительной представленности белка ESAT-6 ранее рассматривали как характеристику вирулентных штаммов [51, 55]. Этот неоднозначный результат доказывает всю сложность роли путей секреции ESAT-6 в патогенности *M. tuberculosis*. Дополнительно он может свидетельствовать в пользу фенотипических различий между штаммами семейства Beijing и штаммами H37Rv.

Другая работа de Keijzer и соавт. посвящена сопоставлению белков штаммов *M. tuberculosis*, относящихся к древним (атипичным) и современным (типичным) сублиниям семейства Beijing [35]. Методом изотопного мечения аминокислот в культуре клеток в сочетании с ВЭЖХ-МС/МС идентифицировано и квантифицировано 2392 белка. Несмотря на то что по белковому профилю обе сублинии оказались крайне схожи, удалось выявить различия в представленности четырех белков – MmpL4 (Rv0450c), Rv3137, Rv1269c и SseA (Rv3283). Из них представленность белков MmpL4 (Rv0450c) и Rv3137

в группе типичных штаммов была значительно выше, чем в атипичных. Среди белков, низкопредставленных в современных Beijing, отмечают SseA (Rv3283), уровень транскриптов которого также был снижен.

Стоит отметить, что в структуре популяции возбудителя туберкулеза в России штаммы семейства Beijing занимают доминирующее положение (от 50 до 80%) [63, 64]. На основании VNTR-анализа представители данного семейства могут быть разделены на несколько типов [65, 66]. На территории страны наиболее распространены типы M2 и M11, составляющие около 80% всех выявляемых изолятов [66, 67]. Исследуя штаммы Beijing B0/W148, относящиеся к типу M11, мы подтвердили их ассоциацию с развитием мультирезистентности, обнаружили новые потенциальные пути формирования устойчивости к противотуберкулезным препаратам, а также описали уникальную геномную перестройку [15].

В свою очередь, нами проведен сравнительный протеомный анализ штаммов кластера Beijing B0/W148 и штамма H37Rv [37]. В общей сложности идентифицировано 1868 белков штаммов кластера B0/W148 и 1560 белков штамма H37Rv, из которых выделена группа из 266 дифференциально представленных белков. Представленность 41 белка в штаммах кластера Beijing B0/W148 была выше, чем в штамме H37Rv, в то время как представленность 225 белков была ниже. Потенциальный биологический эффект этих различий мы оценили по обогащению функциональных категорий белков в ходе Gene Ontology (GO) анализа и с привлечением регуляторной сети генов [68]. Мы предполагаем, что некоторые из описанных нами особенностей представителей кластера Beijing B0/W148 способствуют повышенной вирулентности и успешному распространению этих штаммов. В частности, мы наблюдали увеличение представленности ферментов, ответственных за биосинтез длинноцепочечных жирных кислот, наряду со снижением представленности белков, ответственных за их деградацию. Микобактерии используют длинноцепочечные жирные кислоты для получения микотиоловых кислот и различных липидов, которые рассматривают как основные факторы вирулентности *M. tuberculosis*, проявляющиеся на начальных стадиях инфекции, когда бактерии попадают в макрофаг. Мы также отметили увеличение представленности белка HsaA, вовлеченного в деградацию стероидов. Показано, что *M. tuberculosis* используют внеклеточный холестерин в качестве источника энергии и для биосинтеза липидов клеточной стенки. Указанные наблюдения могут свидетельствовать в пользу повышенной выживаемости микобактерий в макрофагах, что является известной характеристикой штаммов кластера Beijing B0/W148 [69, 70].

Кроме того, нами зафиксирован очень низкий уровень белка SseA в штаммах B0/W148, что, возможно, приводит к накоплению активных форм кислорода и, как следствие, к повреждению ДНК. Это, в свою очередь, может вести к образованию широкого спектра генетических вариантов, способствующих выживанию бактериальной клетки под действием селективного отбора, в частности, во время лекарственной терапии.

Отдельно стоит рассмотреть работы в области протеомики лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* [71–73]. Так, сравнение устойчивых и чувствительных штаммов позволило обнаружить пять белков (Rv0491, Rv1446c, Rv2145, Rv2971 и Rv3028c) с повышенной представленностью в штаммах, устойчивых к изониазиду [72]. Это мембранные белки, которые потенциально могут служить мишенью для новых лекарственных средств. Анализ штаммов, устойчивых к аминогликозидам, выявил в них повышенную представленность белков Rv0685, Rv1876 и Rv3841, ассоциированных с метаболизмом железа [73]. Ассимиляция и утилизация железа играют важную роль в росте, вирулентности и формировании латентной формы *M. tuberculosis*. Pandey и Rodriguez предположили, что ферритин (Rv3841) обязателен для поддержания гомеостаза железа в клетках микобактерий, при его недостатке бактерии становятся более восприимчивыми к воздействию антибиотиков [74]. В сходном исследовании также отмечено увеличение представленности белков Rv1876 и Rv3224, участвующих в обмене железа, с указанием их возможной роли в формировании устойчивости к противотуберкулезным препаратам второго ряда [71]. Комплексное сравнение чувствительных штаммов и штаммов с множественной лекарственной устойчивостью позволило определить в резистентных штаммах такие факторы вирулентности, как каталаза/пероксидаза (Rv1908c), активировавшаяся в фагосомах [50]. Ранее было показано, что каталазная/пероксидазная активность необходима для роста клеток и их персистенции в мышцах и морских свинках [75], а также в моноцитах периферической крови человека [76]. Дополнительно идентифицировали белки Rv0036, Rv2032c, Rv0635, Rv1827 и Rv2896c, вовлеченные в клеточный метаболизм и способствующие внутриклеточному выживанию. В одной из работ последних лет белки Rv2031c, Rv3692 и Rv0444c предлагается использовать в качестве биомаркеров для эффективной серодиагностики резистентных штаммов микобактерий [77].

### Анализ посттрансляционных модификаций

Развитие методов протеомного анализа позволяет не только провести инвентаризацию белков, сопоста-

вить их представленность, но и выявить известные посттрансляционные модификации.

На сегодняшний день описаны такие ПТМ белков *M. tuberculosis*, как O-гликозилирование [33, 78–84], фосфорилирование [85, 86], метилирование [87], ацетилирование [88], липидизация [33, 81, 82, 89–93], дезамидирование [94], N-формилирование [95, 96] и убиквитинирование [94, 97–102].

В частности, характеристика убиквитин-подобного белка Rv2111c *M. tuberculosis* стала первой описанной убиквитин-подобной системой бактерий [101]. Убиквитинирование (присоединение к белку цепи из нескольких молекул короткого белка убиквитина) является универсальной ПТМ у эукариот, служащей сигналом к расщеплению этого белка протеасомой. Идентификация соответствующих белков затруднительна, так как они довольно быстро элиминируются. Изначально сайты убиквитинирования были обнаружены в 41 белке *M. tuberculosis* [103]. На сегодняшний день описаны 602 убиквитин-подобных белка микобактерий, но только у 55 из них экспериментально установлены сайты модификаций [102].

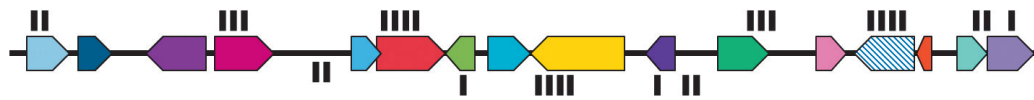
Другая распространенная ПТМ – фосфорилирование. В 301 белке *M. tuberculosis* выявлено 516 сайтов фосфорилирования серина/треонина киназами. Эти данные использовали для поиска возможных мотивов для объяснения фосфорилирования киназами. Удивительно, но шесть из восьми исследованных киназ содержали консервативные мотивы, что указывает на высокий уровень избыточности функций киназ в *M. tuberculosis* [86].

Липопротеины, экспортируемые общим секреторным путем и процессируемые сигнальной пептидазой II, модифицируются путем ацилирования N-концевого цистеина. У микобактерий эти модификации недостаточно хорошо охарактеризованы. Некоторые липопротеины также могут подвергаться O-гликозилированию вблизи N-конца. В данной области часто содержатся несколько остатков треонина, которые служат мишенью для описанных модификаций. Роль таких модификаций пока не известна, однако, есть предположение, что они защищают белки от протеолитического расщепления. По крайней мере, некоторые липопротеины экспортируются на поверхность бактериальной клетки [104, 105] с помощью липидного хвоста, закоренного в наружной мембране [106]. Следовательно, N-концевые части полипептидной цепи уязвимы для протеолитического расщепления, и многие липопротеины в несколько усеченной и растворимой форме можно обнаружить в культуральных супернатантах. В настоящее время наиболее хорошо охарактеризованы гликозилированные липопротеины MPT 83 [107] и SodC [82]. На мышинной модели по-

1. Автоматическая аннотация



2. Соотнесение с экспериментальными пептидами



3. Коррекция аннотации

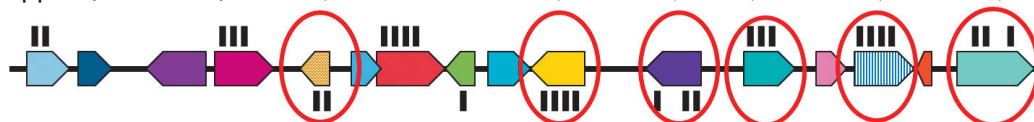


Рис. 3. Исправление аннотации генома с использованием данных масс-спектрометрии

казано, что *O*-маннозилирование (частный случай гликозилирования) приводит к ослаблению патогенных свойств *M. tuberculosis* [108], и с помощью протеомных подходов в супернатанте культуры *M. tuberculosis* выявлено более 40 *O*-гликозилированных белков [83, 109]. Стоит отметить, что известен только один гликозилированный белок МРТ 32, или Ара [78], не относящийся к липопротеинам. Ара является одним из наиболее распространенных внеклеточных белков, секретируемых через общий секреторный путь [110].

Наконец, интерес вызывает обнаружение противотуберкулезного антигена – поверхностного гепаринсвязывающего гемагглютинаина, который рассматривается как компонент для разработки новой вакцины [111, 112]. Уникальность этого белка состоит в метилировании нескольких остатков лизина [87]. Похоже, что эти метилированные остатки лизина имеют иммунологическое значение и входят в состав Т-клеточных эпитопов в гепаринсвязывающем гемагглютинине [113]. Существует достаточно доказательств того, что многие посттрансляционные модификации имеют большое значение для иммунитета и защиты организма от туберкулеза.

Как известно, путем ПТМ может регулироваться продолжительность жизни белков в клетке, их взаимодействие с другими белками, а также ферментативная активность. ПТМ многих эукариотических белков относятся к обязательным стадиям созревания белка. Белки, не подвергнутые ПТМ, оказываются функционально неактивными [114]. На сегодняшний день роль ПТМ белков микобактерий изучена недостаточно.

**Протеогеномный анализ**

Все описанные исследования показывают, что геномная вариабельность штаммов микобактерий от-

ражается на протеомном уровне, и, таким образом, сравнительные протеомные данные могут помочь в понимании фенотипических различий разных групп бактерий, таких, как степень лекарственной чувствительности или вирулентности. С другой стороны, протеомные исследования способствуют корректной расшифровке геномной информации.

Большинство масс-спектрометрических технологий опирается на базы данных, содержащие аннотированные аминокислотные последовательности белка. Однако в результате сравнительного анализа было показано, что аннотация на основании геномных данных зачастую неполная и содержит ошибки. Так, к примеру, последовательность генома *M. tuberculosis* штамма H37Rv была полностью расшифрована в Сенгеровском институте в 1998 году [43] и содержала 3924 открытые рамки считывания (ОРС), но уже через несколько лет авторы сообщили об увеличении ОРС до 3995 [115]. В настоящее время аннотированная версия *M. tuberculosis* H37Rv (27-я версия согласно базе данных TubercuList) содержит 4018 белкокодирующих генов, из которых 26% относятся к классу белков с гипотетической функцией. При этом протеомные исследования в значительной мере помогли переработать геномную аннотацию, представляя экспериментальные доказательства в случае ряда не аннотированных ранее генов, или генов, сайты инициации транскрипции которых были неправильно идентифицированы, а также просто подтверждая существующие ОРС (рис. 3). Kelkar и соавт. в 2011 на основании данных МС/МС-анализа идентифицировали 3176 белков *M. tuberculosis* H37Rv, а также 250 пептидов, не соответствующих имеющейся аннотации. В итоге аннотацию дополнили 41 белком и уточнили сайты инициации транскрипции 33 генов [34]. В том же году исследователи



из Норвегии с помощью MS-подходов исправили аннотацию еще 24 генов штамма H37Rv [116]. В целом же следует отметить, что за последние несколько лет проведено несколько крупных протеомных исследований *M. tuberculosis*, в каждом из которых описано от 20 до 40 не аннотированных ранее белков и были скорректированы текущие аннотации генома [23, 34, 116, 117].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие протеомики открыло новые подходы к изучению туберкулеза, облегчив решение многих сложных вопросов, в том числе и взаимодействий бактерии с хозяйской клеткой. Несмотря на то что протеомика отстает от геномики и транскриптомики из-за инструментальных проблем и недостаточной чувствительности, появляется все больше работ, в которых инфекционные агенты изучают с использованием протеомных подходов. Так, с помощью протеомного анализа описаны факторы вирулентности и механизмы их действия, реакция хозяина и патогена на инфекционный процесс. Протеомика позволила более полно описать уникальные отличительные особенности различных штаммов *M. tuberculosis*.

Изучение возбудителя туберкулеза на протеомном уровне может способствовать установлению метаболических и физиологических особенностей, необходимых для успешного протекания инфекционного процесса, а также механизмов вирулентности, позволяющих *M. tuberculosis* модулировать иммунный ответ хозяина. Белки, синтезируемые при попадании микобактерий внутрь клеток хозяина, важны для их выживания в этих условиях, поэтому они считаются потенциальными мишенями для разрабатываемых лекарственных препаратов. Создание новых препаратов и схем лечения особенно необходимо именно сейчас, когда широкое распространение получили штаммы с множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Таким образом, изучение полного протеомного профиля микобактерий может способствовать лучшему пониманию физиологии патогена и, возможно, лечению туберкулеза.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 14-15-00689).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Azhikina T., Skvortsov T., Radaeva T., Mardanov A., Ravin N., Apt A., Sverdlov E. // *Biotechniques*. 2010. V. 48. № 2. P. 139–144.
- Tailleux L., Waddell S.J., Pelizzola M., Mortellaro A., Withers M., Tanne A., Castagnoli P.R., Gicquel B., Stoker N.G., Butcher P.D., et al. // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 1. P. e1403.
- Talaat A.M., Lyons R., Howard S.T., Johnston S.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 13. P. 4602–4607.
- Talaat A.M., Ward S.K., Wu C.W., Rondon E., Tavano C., Bannantine J.P., Lyons R., Johnston S.A. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 11. P. 4265–4274.
- Tortoli E. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006. V. 48. № 2. P. 159–178.
- WHO. World Health Statistic. 2015.
- Warner D.F., Mizrahi V. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 10. P. 1107–1108.
- Akhtar S., Sarkar S., Mishra A., Sarkar D. // *Anal. Biochem.* 2011. V. 417. № 2. P. 286–288.
- Ghodbane R., Asmar S., Betzner M., Linet M., Pierquin J., Raoult D., Drancourt M. // *J. Clin. Microbiol.* 2015. V. 53. № 8. P. 2693–2696.
- Tyler A.D., Christianson S., Knox N.C., Mabon P., Wolfe J., van Domselaar G., Graham M.R., Sharma M.K. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 2. P. e0148676.
- Bespyatykh J.A., Zimenkov D.V., Shitikov E.A., Kulagina E.V., Lapa S.A., Gryadunov D.A., Ilina E.N., Govorun V.M. // *Infect. Genet. Evol.* 2014. V. 26. P. 41–46.
- Chernyaeva E.N., Shulgina M.V., Rotkevich M.S., Dobrynin P.V., Simonov S.A., Shitikov E.A., Ischenko D.S., Karpova I.Y., Kostryukova E.S., Ilina E.N., et al. // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. P. 308.
- Ilina E.N., Shitikov E.A., Ikryannikova L.N., Alekseev D.G., Kamashev D.E., Malakhova M.V., Parfenova T.V., Afanas'ev M.V., Ischenko D.S., Bazaleev N.A., et al. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. P. e56577.
- Shitikov E., Ilina E., Chernousova L., Borovskaya A., Rukin I., Afanas'ev M., Smirnova T., Vorobyeva A., Larionova E., Andreevskaya S., et al. // *Infect. Genet. Evol.* 2012. V. 12. № 4. P. 838–845.
- Shitikov E.A., Bespyatykh J.A., Ischenko D.S., Alexeev D.G., Karpova I.Y., Kostryukova E.S., Isaeva Y.D., Nosova E.Y., Mokrousov I.V., Vyazovaya A.A., et al. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 1. P. e84971.
- Sotnikova E.A., Shitikov E.A., Malakhova M.V., Kostryukova E.S., Ilina E.N., Atrasheuskaya A.V., Ignatyev G.M., Vinokurova N.V., Gorbachyov V.Y. // *Genome Announc.* 2016. V. 4. № 2. P. e00182–00116.
- Wilkins M.R., Pasquali C., Appel R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J.C., Yan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Humphery-Smith I., et al. // *Biotechnology (N.Y.)*. 1996. V. 14. № 1. P. 61–65.
- James P. // *Q. Rev. Biophys.* 1997. V. 30. № 4. P. 279–331.
- Hakkinen L., Uitto V.J., Larjava H. // *Periodontol.* 2000. V. 24. P. 127–152.
- Molloy M.P., Witzmann F.A. // *Brief Funct. Genomic Proteomic*. 2002. V. 1. № 1. P. 23–39.
- Monteoliva L., Albar J.P. // *Brief Funct. Genomic Proteomic*. 2004. V. 3. № 3. P. 220–239.
- Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H., Aebersold R. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 10. P. 994–999.
- Schubert O.T., Mouritsen J., Ludwig C., Rost H.L., Rosenberger G., Arthur P.K., Claassen M., Campbell D.S., Sun Z., Farrah T., et al. // *Cell Host Microbe*. 2013. V. 13. № 5. P. 602–612.
- Rosenkrands I., King A., Weldingh K., Moniatte M., Moertz E., Andersen P. // *Electrophoresis*. 2000. V. 21. № 17. P. 3740–3756.
- Mehaffy C., Hess A., Prenni J.E., Mathema B., Kreiswirth B., Dobos K.M. // *Proteomics*. 2010. V. 10. № 10. P. 1966–1984.

26. Sonnenberg M.G., Belisle J.T. // *Infect. Immun.* 1997. V. 65. № 11. P. 4515–4524.
27. Jungblut P.R., Schaible U.E., Mollenkopf H.J., Zimny-Arndt U., Raupach B., Mattow J., Halada P., Lamer S., Hagens K., Kaufmann S.H. // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 33. № 6. P. 1103–1117.
28. Gu S., Chen J., Dobos K.M., Bradbury E.M., Belisle J.T., Chen X. // *Mol. Cell Proteomics.* 2003. V. 2. № 12. P. 1284–1296.
29. Schmidt F., Donahoe S., Hagens K., Mattow J., Schaible U.E., Kaufmann S.H., Aebersold R., Jungblut P.R. // *Mol. Cell Proteomics.* 2004. V. 3. № 1. P. 24–42.
30. Mawuenyega K.G., Forst C.V., Dobos K.M., Belisle J.T., Chen J., Bradbury E.M., Bradbury A.R., Chen X. // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. № 1. P. 396–404.
31. de Souza G.A., Fortuin S., Aguilar D., Pando R.H., McEvoy C.R., van Helden P.D., Koehler C.J., Thiede B., Warren R.M., Wiker H.G. // *Mol. Cell Proteomics.* 2010. V. 9. № 11. P. 2414–2423.
32. Malen H., de Souza G.A., Pathak S., Softeland T., Wiker H.G. // *BMC Microbiol.* 2011. V. 11. P. 18.
33. Bell C., Smith G.T., Sweredoski M.J., Hess S. // *J. Proteome Res.* 2012. V. 11. № 1. P. 119–130.
34. Kelkar D.S., Kumar D., Kumar P., Balakrishnan L., Muthusamy B., Yadav A.K., Shrivastava P., Marimuthu A., Anand S., Sundaram H., et al. // *Mol. Cell Proteomics.* 2011. V. 10. № 12. P. M111.011627.
35. de Keijzer J., de Haas P.E., de Ru A.H., van Veelen P.A., van Soelingen D. // *Mol. Cell Proteomics.* 2014. V. 13. № 10. P. 2632–2645.
36. Bespyatykh J., Shitikov E., Altukhov I., Butenko I., Alexeev D., Melnikova N., Zhuravlev V., Ilina E. // *ProkaGenomics.* 2015. V. P. GLOB 06. P. 117.
37. Bespyatykh J., Shitikov E., Butenko I., Altukhov I., Alexeev D., Mokrousov I., Dogonadze M., Zhuravlev V., Yablonsky P., Ilina E., et al. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 28985.
38. Treumann A., Thiede B. // *Expert Rev. Proteomics.* 2010. V. 7. № 5. P. 647–653.
39. Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M. // *Mol. Cell Proteomics.* 2002. V. 1. № 5. P. 376–386.
40. Wang H., Dong D., Tang S., Chen X., Gao Q. // *J. Proteome Res.* 2013. V. 12. № 5. P. 2055–2066.
41. Gunawardena H.P., Feltcher M.E., Wrobel J.A., Gu S., Braunstein M., Chen X. // *J. Proteome Res.* 2013. V. 12. № 12. P. 5463–5474.
42. Gillet L.C., Navarro P., Tate S., Rost H., Selevsek N., Reiter L., Bonner R., Aebersold R. // *Mol. Cell Proteomics.* 2012. V. 11. № 6. P. O111.016717.
43. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., 3rd, et al. // *Nature.* 1998. V. 393. № 6685. P. 537–544.
44. Xiong Y., Chalmers M.J., Gao F.P., Cross T.A., Marshall A.G. // *J. Proteome Res.* 2005. V. 4. № 3. P. 855–861.
45. Covert B.A., Spencer J.S., Orme I.M., Belisle J.T. // *Proteomics.* 2001. V. 1. № 4. P. 574–586.
46. Samanich K.M., Belisle J.T., Sonnenberg M.G., Keen M.A., Zolla-Pazner S., Laal S. // *J. Infect. Dis.* 1998. V. 178. № 5. P. 1534–1538.
47. Park H.D., Guinn K.M., Harrell M.I., Liao R., Voskuil M.I., Tompa M., Schoolnik G.K., Sherman D.R. // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 48. № 3. P. 833–843.
48. Rodriguez J.G., Hernandez A.C., Helguera-Repetto C., Aguilar Ayala D., Guadarrama-Medina R., Anzola J.M., Bustos J.R., Zambrano M.M., Gonzalez Y.M.J., Garcia M.J., et al. // *MBio.* 2014. V. 5. № 3. P. e01125–01114.
49. Cho S.H., Goodlett D., Franzblau S. // *Tuberculosis (Edinb.).* 2006. V. 86. № 6. P. 445–460.
50. Singhal N., Sharma P., Kumar M., Joshi B., Bisht D. // *Proteome Sci.* 2012. V. 10. № 1. P. 14.
51. Tan T., Lee W.L., Alexander D.C., Grinstein S., Liu J. // *Cell Microbiol.* 2006. V. 8. № 9. P. 1417–1429.
52. Brosch R., Pym A.S., Gordon S.V., Cole S.T. // *Trends Microbiol.* 2001. V. 9. № 9. P. 452–458.
53. Mattow J., Jungblut P.R., Schaible U.E., Mollenkopf H.J., Lamer S., Zimny-Arndt U., Hagens K., Muller E.C., Kaufmann S.H. // *Electrophoresis.* 2001. V. 22. № 14. P. 2936–2946.
54. Mattow J., Schaible U.E., Schmidt F., Hagens K., Siejak F., Brestrich G., Haeselbarth G., Muller E.C., Jungblut P.R., Kaufmann S.H. // *Electrophoresis.* 2003. V. 24. № 19–20. P. 3405–3420.
55. He X.Y., Zhuang Y.H., Zhang X.G., Li G.L. // *Microbes Infect.* 2003. V. 5. № 10. P. 851–856.
56. Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K.E., Kato-Maeda M., Parkhill J., Malla B., Berg S., Thwaites G., et al. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 10. P. 1176–1182.
57. Parwati I., van Crevel R., van Soelingen D. // *Lancet Infect Dis.* 2010. V. 10. № 2. P. 103–111.
58. Hanekom M., Gey van Pittius N.C., McEvoy C., Victor T.C., van Helden P.D., Warren R.M. // *Tuberculosis (Edinb.).* 2011. V. 91. № 6. P. 510–523.
59. Dormans J., Burger M., Aguilar D., Hernandez-Pando R., Kremer K., Roholl P., Arend S.M., van Soelingen D. // *Clin. Exp. Immunol.* 2004. V. 137. № 3. P. 460–468.
60. Pfeiffer C., Betts J.C., Flynn H.R., Lukey P.T., van Helden P. // *Microbiology.* 2005. V. 151. Pt 4. P. 1139–1150.
61. Monahan I.M., Betts J., Banerjee D.K., Butcher P.D. // *Microbiology.* 2001. V. 147. Pt 2. P. 459–471.
62. Sherman D.R., Voskuil M., Schnappinger D., Liao R., Harrell M.I., Schoolnik G.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 13. P. 7534–7539.
63. Mokrousov I., Otten T., Vyazovaya A., Limeschenko E., Filipenko M.L., Sola C., Rastogi N., Steklova L., Vyshnevskiy B., Narvskaya O. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003. V. 22. № 6. P. 342–348.
64. Норкина О.В., Киншт В.Н., Мокроусов И.В., Курунов Ю.Н., Краснов В.А. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2003. № 3. P. 9–18.
65. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Millet J., Otten T., Vishnevsky B., Rastogi N. // *J. Clin. Microbiol.* 2008. V. 46. № 11. P. 3576–3584.
66. Surikova O.V., Voitech D.S., Kuzmicheva G., Tatkov S.I., Mokrousov I.V., Narvskaya O.V., Rot M.A., van Soelingen D., Filipenko M.L. // *Eur. J. Epidemiol.* 2005. V. 20. № 11. P. 963–974.
67. Drobniewski F., Balabanova Y., Nikolayevsky V., Ruddy M., Kuznetsov S., Zakharova S., Melentyev A., Fedorin I. // *Jama.* 2005. V. 293. № 22. P. 2726–2731.
68. Peterson E.J., Reiss D.J., Turkarslan S., Minch K.J., Rustad T., Plaisier C.L., Longabaugh W.J., Sherman D.R., Baliga N.S. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 18. P. 11291–11303.
69. Lasunskaja E., Ribeiro S.C., Manicheva O., Gomes L.L., Suffys P.N., Mokrousov I., Ferrazoli L., Andrade M.R., Kritski A., Otten T., et al. // *Microbes Infect.* 2010. V. 12. № 6. P. 467–475.
70. Pardini M., Niemann S., Varaine F., Iona E., Meacci F., Orru G., Yesilkaya H., Jarosz T., Andrew P., Barer M., et al. // *Tuberculosis (Edinb.).* 2009. V. 89. № 4. P. 317–324.
71. Kumar B., Sharma P., Sharma P., Katoch V.M., Venkatesan K., Bisht D. // *J. Proteomics.* 2013. V. 94. P. 68–77.
72. Mattow J., Siejak F., Hagens K., Becher D., Albrecht D., Krahl A., Schmidt F., Jungblut P.R., Kaufmann S.H., Schaible U.E. // *Proteomics.* 2006. V. 6. № 8. P. 2485–2494.

73. Sharma D., Kumar B., Lata M., Joshi B., Venkatesan K., Shukla S., Bisht D. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 10. P. e0139414.
74. Pandey R., Rodriguez G.M. // *Infect. Immun.* 2012. V. 80. № 10. P. 3650–3659.
75. Li Z., Kelley C., Collins F., Rouse D., Morris S. // *J. Infect. Dis.* 1998. V. 177. № 4. P. 1030–1035.
76. Manca C., Paul S., Barry C.E., 3rd, Freedman V.H., Kaplan G. // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. № 1. P. 74–79.
77. Zhang L., Wang Q., Wang W., Liu Y., Wang J., Yue J., Xu Y., Xu W., Cui Z., Zhang X., et al. // *Proteome Sci.* 2012. V. 10. P. 12.
78. Dobos K.M., Khoo K.H., Swiderek K.M., Brennan P.J., Belisle J.T. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. № 9. P. 2498–2506.
79. Espitia C., Mancilla R. // *Clin. Exp. Immunol.* 1989. V. 77. № 3. P. 378–383.
80. Herrmann J.L., Delahay R., Gallagher A., Robertson B., Young D. // *FEBS Lett.* 2000. V. 473. № 3. P. 358–362.
81. Herrmann J.L., O'Gaora P., Gallagher A., Thole J.E., Young D.B. // *EMBO J.* 1996. V. 15. № 14. P. 3547–3554.
82. Sartain M.J., Belisle J.T. // *Glycobiology.* 2009. V. 19. № 1. P. 38–51.
83. Smith G.T., Sweredoski M.J., Hess S. // *J. Proteomics.* 2014. V. 97. P. 296–306.
84. VanderVen B.C., Harder J.D., Crick D.C., Belisle J.T. // *Science.* 2005. V. 309. № 5736. P. 941–943.
85. Kusebauch U., Ortega C., Ollodart A., Rogers R.S., Sherman D.R., Moritz R.L., Grundner C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 25. P. 9265–9270.
86. Priscic S., Dankwa S., Schwartz D., Chou M.F., Locasale J.W., Kang C.M., Bemis G., Church G.M., Steen H., Husson R.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 16. P. 7521–7526.
87. Pethe K., Bifani P., Drobecq H., Sergheraert C., Debrie A.S., Loch C., Menozzi F.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 16. P. 10759–10764.
88. Okkels L.M., Muller E.C., Schmid M., Rosenkrands I., Kaufmann S.H., Andersen P., Jungblut P.R. // *Proteomics.* 2004. V. 4. № 10. P. 2954–2960.
89. Lancioni C.L., Li Q., Thomas J.J., Ding X., Thiel B., Drage M.G., Pecora N.D., Ziady A.G., Shank S., Harding C.V., et al. // *Infect. Immun.* 2011. V. 79. № 2. P. 663–673.
90. Okuda S., Tokuda H. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2011. V. 65. P. 239–259.
91. Sanchez A., Espinosa P., Esparza M.A., Colon M., Bernal G., Mancilla R. // *Scand. J. Immunol.* 2009. V. 69. № 1. P. 20–28.
92. Sanchez A., Espinosa P., Garcia T., Mancilla R. // *Clin. Dev. Immunol.* 2012. V. 2012. P. 950503.
93. Sutcliffe I.C., Harrington D.J. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2004. V. 28. № 5. P. 645–659.
94. Striebel F., Imkamp F., Sutter M., Steiner M., Mamedov A., Weber-Ban E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. V. 16. № 6. P. 647–651.
95. Chun T., Serbina N.V., Nolt D., Wang B., Chiu N.M., Flynn J.L., Wang C.R. // *J. Exp. Med.* 2001. V. 193. № 10. P. 1213–1220.
96. Doi T., Yamada H., Yajima T., Wajjwalku W., Hara T., Yoshikai Y. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. № 6. P. 3806–3813.
97. Barandun J., Delley C.L., Weber-Ban E. // *BMC Biol.* 2012. V. 10. P. 95.
98. Burns K.E., Cerda-Maira F.A., Wang T., Li H., Bishai W.R., Darwin K.H. // *Mol. Cell.* 2010. V. 39. № 5. P. 821–827.
99. Burns K.E., Pearce M.J., Darwin K.H. // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. № 11. P. 2933–2935.
100. Cerda-Maira F.A., Pearce M.J., Fuortes M., Bishai W.R., Hubbard S.R., Darwin K.H. // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 77. № 5. P. 1123–1135.
101. Pearce M.J., Mintseris J., Ferreyra J., Gygi S.P., Darwin K.H. // *Science.* 2008. V. 322. № 5904. P. 1104–1107.
102. Tung C.W. // *BMC Bioinformatics.* 2012. V. 13. P. 40.
103. Poulsen C., Akhter Y., Jeon A.H., Schmitt-Ulms G., Meyer H.E., Stefanski A., Stuhler K., Wilmanns M., Song Y.H. // *Mol. Syst. Biol.* 2010. V. 6. № 386. P. 10.1038/msb.2010.1039.
104. Braibant M., Lefevre P., de Wit L., Peirs P., Ooms J., Huygen K., Andersen A.B., Content J. // *Gene.* 1996. V. 176. № 1–2. P. 171–176.
105. Harboe M., Wiker H.G., Ulvund G., Lund-Pedersen B., Andersen A.B., Hewinson R.G., Nagai S. // *Infect. Immun.* 1998. V. 66. № 1. P. 289–296.
106. Young D.B., Garbe T.R. // *Res. Microbiol.* 1991. V. 142. № 1. P. 55–65.
107. Michell S.L., Whelan A.O., Wheeler P.R., Panico M., Easton R.L., Etienne A.T., Haslam S.M., Dell A., Morris H.R., Reason A.J., et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 18. P. 16423–16432.
108. Liu C.F., Tonini L., Malaga W., Beau M., Stella A., Bouyssie D., Jackson M.C., Nigou J., Puzo G., Guilhot C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 16. P. 6560–6565.
109. Gonzalez-Zamorano M., Mendoza-Hernandez G., Xolalpa W., Parada C., Vallecillo A.J., Bigi F., Espitia C. // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. № 2. P. 721–733.
110. Nagai S., Wiker H.G., Harboe M., Kinomoto M. // *Infect. Immun.* 1991. V. 59. № 1. P. 372–382.
111. Guerrero G.G., Debrie A.S., Loch C. // *Vaccine.* 2010. V. 28. № 27. P. 4340–4347.
112. Vidal Pessolani M.C., Marques M.A., Reddy V.M., Loch C., Menozzi F.D. // *Microbes Infect.* 2003. V. 5. № 7. P. 677–684.
113. Temmerman S., Pethe K., Parra M., Alonso S., Rouanet C., Pickett T., Drowart A., Debrie A.S., Delogu G., Menozzi F.D., et al. // *Nat. Med.* 2004. V. 10. № 9. P. 935–941.
114. Jensen O.N. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 6. P. 391–403.
115. Camus J.C., Pryor M.J., Medigue C., Cole S.T. // *Microbiology.* 2002. V. 148. Pt 10. P. 2967–2973.
116. de Souza G.A., Arntzen M.O., Fortuin S., Schurch A.C., Malen H., McEvoy C.R., van Soolingen D., Thiede B., Warren R.M., Wiker H.G. // *Mol. Cell Proteomics.* 2011. V. 10. № 1. P. M110.002527.
117. de Souza G.A., Malen H., Softeland T., Saelensminde G., Prasad S., Jonassen I., Wiker H.G. // *BMC Genomics.* 2008. V. 9. P. 316.
118. Yadeta K.A., Elmore J.M., Coaker G. // *Front Plant Sci.* 2013. V. 4 P. 10.3389/fpls.2013.00086.