

УДК 577.29

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

Д. В. Игнатов¹, Т. А. Скворцов¹, К. Б. Майоров², А. С. Апт², Т. Л. Ажикина^{1*}¹Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Центральный 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. Продemonстрировано, 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 мышях 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- γ , TNF- α 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)₉) 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	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGСAGGСaGGСGGТGGТGGGСAGGС
	2А short	GССТGСССАС
Супрессионный адаптер 2В	2В long	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGСAGСGGAGGСGGТAGGAGGСGGА
	2В short	ТССGССТССТ
Внешний праймер	T7	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGС
Внутренние праймеры	pr1А	AGСGTGGТСGСGGССGAGAG
	pr1В	AGGGСGTGGТGСGGAGGGСGGС
	pr2А	AGGСAGGСGGТGGТGGGСAGGС
	pr2В	AGСGGAGGСGGТAGGAGGСGGА

25 мкл, содержащем 10 пмоль праймера T7. 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-

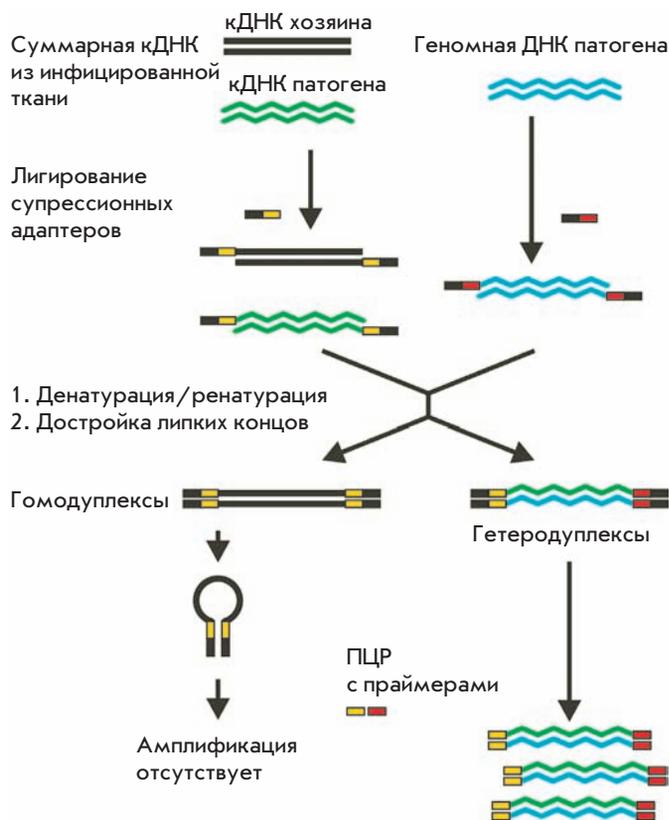


Рис. 1. Клонирование идентичных последовательностей. К фрагментам геномной ДНК патогена и тотальной кДНК лигируют специфические олигонуклеотидные адаптеры. После совместной денатурации и ренатурации в смеси образуется два типа дуплексов. Благодаря эффекту супрессии ПЦР амплифицируются только гетеродуплексы, 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 микобактина
MAV_1696	Глутаматдегидрогеназа
MAV_1304	NarH; нитратредуктаза, β-субъединица
MAV_2379	MetH; витамин B ₁₂ -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 ₁ F ₀ , 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). 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 N₂O. 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-CoA-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,

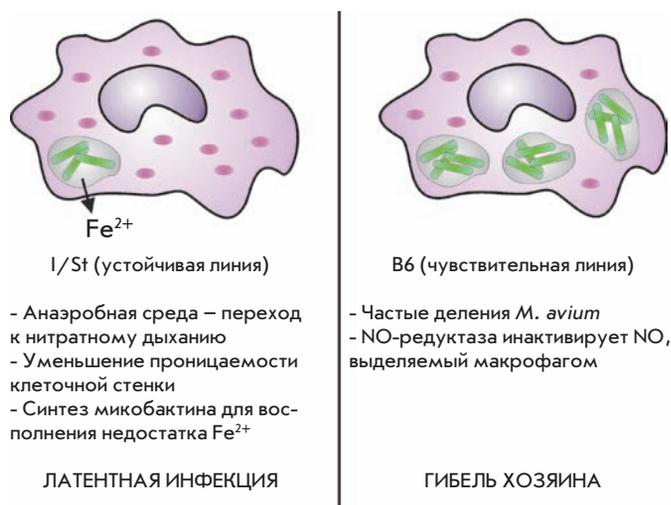
при персистенции в мышцах восприимчивой линии повышается уровень дыхания для обеспечения энергетических потребностей патогена. Ген локуса *MAV_4040* кодирует одну из субъединиц NADH-дегидрогеназы I типа, что характерно для острой фазы инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*, и экспоненциального размножения 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⁺-зависимую глутаматдегидрогеназу. Считается, что, в отличие от NADP⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы, осуществляющей ассимиляцию азота, у микроорганизмов этот фермент участвует в катаболизме глутамата, и экспрессия этого гена не зависит от концентрации NH₄⁺. Однако недавно у *M. smeg-*



- Анаэробная среда – переход к нитратному дыханию
 - Уменьшение проницаемости клеточной стенки
 - Синтез микобактина для восполнения недостатка Fe^{2+}

ЛАТЕНТНАЯ ИНФЕКЦИЯ

- Частые деления *M. avium*
 - NO-редуктаза инактивирует NO, выделяемый макрофагом

ГИБЕЛЬ ХОЗЯИНА

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

matis было показано повышение экспрессии гена *msmeg_4699*, ортологичного *MAV_1696*, возникающее в ответ на дефицит NH_4^+ в окружающей среде [27]. Кроме того, в геноме *M. avium* отсутствует ген, кодирующий $NADP^+$ -зависимую глутаматдегидрогеназу [28]. Существует предположение, что у микобактерий 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 B_{12} -зависимую метионинсинтазу *MetH*, повышенно 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_{12}*-независимая метионинсинтаза, экспрессия которой при наличии в среде витамина 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 β -субъединицу нитратредуктазы, представляет особый интерес. Этот ген является ортологом 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 АВС-транспортеров, участвующих в ремоделировании клеточной мембраны [32].

Генный локус *MAV_4679*, кодирующий фермент, участвующий в синтезе миколовых кислот, повышенно 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- δ -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.