

УДК 57.085.23

# Внеклеточные везикулы микоплазм способны проникать в клетки эукариот *in vitro* и модулировать их протеом

А. А. Музыкантов<sup>1\*</sup>, Э. В. Рожина<sup>2</sup>, Р. Ф. Фахруллин<sup>2</sup>, М. О. Гомзикова<sup>2</sup>, М. А. Золотых<sup>2</sup>,  
О. А. Чернова<sup>1</sup>, В. М. Чернов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, 420111 Россия

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

\*E-mail: muzaleksei@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2021

Принята к печати 09.11.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11506

**РЕФЕРАТ** Внеклеточные везикулы (ВВ), продуцируемые бактериями, транспортируют соединения широкого спектра, включая белки, ДНК и РНК, опосредуют межклеточные взаимодействия и могут быть важными участниками механизмов персистенции инфекционных агентов. Исследование посвящено проверке предположения, что ВВ микоплазм, мельчайших из способных к самостоятельному воспроизведению прокариот, объединенных в класс Mollicutes, могут проникать в клетки эукариот и модулировать их иммунореактивность. Эту гипотезу проверяли на системе, моделирующей взаимодействие культивируемых *in vitro* фибробластов кожи человека и изолированных везикул *Acholeplasma laidlawii* – убиквитарной микоплазмы, – инфицирующей высших эукариот и являющейся основным контаминантом клеточных культур и вакцинных препаратов. Использовали конфокальную лазерную сканирующую микроскопию и протеомное профилирование с применением комбинации 2D-DIGE и MALDI-TOF/TOF, программы анализа масс-спектров Mascot и инструмент функциональной аннотации DAVID. В результате этих исследований впервые установлено, что ВВ *A. laidlawii* способны проникать в эукариотические клетки *in vitro* и модулировать клеточный протеом. Молекулярные механизмы взаимодействия везикул микоплазмы с клетками эукариот и вклад соответствующих наноструктур в молекулярную машинерию клеточной перmissивности еще предстоит выяснить. Изучение этих аспектов актуально как для фундаментальных исследований логики жизни простейших прокариот, так и практических разработок эффективного контроля гипермутабельных бактерий, инфицирующих человека, животных и растения, контаминирующих клеточные культуры и вакцинные препараты.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** микоплазмы, везикулы, интернализация, фибробласты человека, протеом.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВВ – внеклеточные везикулы; HSF – фибробласты кожи человека; 2D-DIGE – дифференциальный двумерный электрофорез; MALDI-TOF/TOF – времяпролетная/времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; PBS – фосфатно-солевой буфер.

## ВВЕДЕНИЕ

Молекулярные механизмы взаимодействия микоплазм (мельчайших, способных к самостоятельному воспроизведению прокариот, объединенных в класс Mollicutes) с клетками эукариот, обеспечивающие персистенцию инфекционных агентов, не ясны [1]. К настоящему времени установлено, что взаимодей-

ствие клеток микро- и макроорганизмов опосредуется ВВ, которые переносят соединения широкого спектра, включая белки, ДНК, РНК, в том числе короткие РНК [2]. ВВ бактерий могут проникать в клетки эукариот и модулировать иммунореактивность – такая способность обнаружена у некоторых возбудителей персистентных инфекций. ВВ мико-

плазм описаны [3, 4], но доказательства их способности проникать в эукариотические клетки пока отсутствуют.

В представленной работе изучена способность ВВ *A. laidlawii* – убиквитарной микоплазмы, инфицирующей высших эукариот, и основного контаминанта клеточных культур и вакцинных препаратов, проникать в культивируемые *in vitro* клетки эукариот и модулировать клеточный протеом.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Культуры клеток

Использовали культуру *A. laidlawii* PG8B в середине лог-фазы роста и первичную культуру фибробластов кожи человека (HSF – Human Skin Fibroblast). Фибробласты получали из биопсий кожи и культивировали в среде αMEM с добавлением 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10% бычьей сыворотки и 2 мМ L-глутамин при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Образцы кожи человека отбирали в соответствии с протоколом эксперимента, утвержденным Экспертной комиссией по биомедицинской этике Казанского федерального университета и Республиканской клинической больницы (№ 218, 15.11.2012). От доноров были получены письменные информированные согласия.

### Выделение внеклеточных везикул

ВВ *A. laidlawii* выделяли как описано [3]. Изолированные везикулы анализировали с помощью трансмиссивной электронной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии как описано [3]. Микровезикулы, продуцируемые HSF в присутствии и в отсутствие везикул *A. laidlawii*, выделяли согласно [5]. Отбирали культуральную среду контрольных и опытных культур HSF. Клетки и дебрис удаляли с помощью центрифугирования (1500 *g*, 10 мин). Супернатант центрифугировали при 100000 *g* в течение 70 мин (ротор MLA-80, Beckman Coulter). Осадки ресуспендировали в PBS и центрифугировали при 100000 *g*, 70 мин. Промытые осадки ресуспендировали в PBS, наслаивали на градиент плотности Optiprep (10–20–30–40–45%) и ультрацентрифугировали при 100000 *g* в течение 17 ч. Фракции отбирали, трижды отмывали от Optiprep, суспендировали в PBS и хранили при 4°C до анализа. ВВ *A. laidlawii* добавляли к HSF в количестве 100 мкг (по общему белку) и инкубировали в течение 4 ч. Культуры фибробластов с ВВ и без ВВ составили опыт и контроль соответственно. Везикулярную ДНК *A. laidlawii* детектировали с помощью ПЦР как описано [6].

### Анализ с помощью конфокальной микроскопии

Препараты ВВ *A. laidlawii* окрашивали DiI, акридиновым оранжевым и Hoechst 33342 для визуализации мембраны, РНК и ДНК соответственно. Препараты микровезикул HSF окрашивали с помощью антител против р53, конъюгированными с Alexa Fluor 647 и DiO для визуализации мембраны. Несвязавшиеся молекулы красителей удаляли с использованием концентратора с пределом отсечения 3 кДа. Препараты исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM 780.

Для визуализации интернализации ВВ *A. laidlawii* фибробласты культивировали на покровных стеклах. ВВ *A. laidlawii* окрашивали флуоресцентными красителями, как описано выше, и добавляли к HSF. Фибробласты промывали буфером и фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом. Ядра клеток окрашивали DAPI, а F-актин – с помощью антител, конъюгированных с Alexa Fluor 488. Слайды исследовали под микроскопом, данные обрабатывали в программе ZEN 9.0.

Микроскопические изображения окрашенных HSF и ВВ *A. laidlawii* в темном поле получали на микроскопе Olympus BX51 [7]. Данные обрабатывали в программе Exponent 7.

### Иммуноферментный анализ

Для количественного определения цитокинов HSF удаляли центрифугированием, концентрации интерлейкинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в супернатанте определяли методом ELISA («Вектор-Бест», Россия) согласно протоколу производителя.

### Протеомный анализ

Протеомный анализ HSF проводили согласно [8]. Клетки открепляли от пластика с помощью трипсина, трижды отмывали от питательной среды с помощью PBS. Осадки клеток растворяли в буфере (8 М мочевины, 2 М тиомочевина, 16.7% раствора (30% CHAPS + 10% NP-40)) и обрабатывали смесью нуклеаз (Micrococcal Nuclease Mix). Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Бредфорд. Белки окрашивали с красителями CyDye DIGE Cy3 (контроль) и CyDye DIGE Cy5 (опыт), реакцию останавливали с помощью 10 мМ раствора лизина. Эффективность окрашивания проверяли с помощью 1D-электрофореза в ПААГ и сканирования геля на сканере Turphoon Trio. Образцы объединяли (брали равные количества каждого образца), добавляли дитиотреитол (ДТТ) до 80 мМ и амфолиты 3–10 до 0.2% и разделяли с помощью 2D-электрофореза. Гели сканировали на сканере Turphoon Trio. Для визуализации белковых пятен гели окрашивали нитратом серебра.

Белковые пятна на гелях анализировали с помощью программы PDQuest v.8.01 (Bio-Rad). Вырезали пятна, соотношение содержания белка в которых в контроле и опыте было больше 1.5. Кусочки геля промывали в смеси ацетонитрил : 200 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1 : 1). Затем инкубировали с ДТТ и йодацетамидом. Дегидратацию гелей проводили с помощью ацетонитрила. К гелю добавляли рабочий раствор трипсина, инкубировали в течение 60 мин при 4°C. Трипсинолиз проводили при 37°C в течение ночи. Пептиды экстрагировали с помощью 0.5% раствора ТФУ. Идентификацию белков с помощью MALDI-времяпролетно-времяпролетного масс-спектрометра Ultraflextreme проводили согласно протоколу [8]. Образцы пептидов смешивали с раствором матрицы (1% 2,5-дигидроксibenзойная кислота, 20% ацетонитрил, 0.5% ТФУ), наносили на мишень и высушивали на воздухе. Масс-спектрометрию проводили в режиме положительных ионов в диапазоне 500–4000 Да. Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.007% с учетом возможного окисления метионинов и модификации цистеинов акриламидом. Белки идентифицировали с использованием программы Mascot в режиме Peptide Mass Fingerprint (Matrix Science) и базы UniProt. При score ≥ 44 идентификацию белка считали надежной ( $p < 0.05$ ).

Для функциональной аннотации идентифицированных белков использовали базу данных DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Определяли метаболические пути и клеточные процессы, в которых эти белки участвуют (согласно KEGG); геновую онтологию определяли с помощью GO (молекулярная функция, биологический процесс, локализация продукта).

### Вестерн-блоттинг

Таргетное количественное определение белков проводили с помощью Вестерн-блоттинга. Белки из лизатов HSF разделяли в ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond C. Использовали антитела (Sigma, США) к p53, HSP7C и β-актину, а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Мембраны инкубировали последовательно с первичными и вторичными антителами, а затем окрашивали 3,3'-диаминобензидином (Sigma). Гели анализировали в программе ImageJ, используя в качестве контроля β-актин для нормирования интенсивности сигналов исследуемых образцов.

### Статистический анализ

Все эксперименты проводили в трех повторностях. Образцы анализировали через 4 ч после инкубации

HSF с ВВ микоплазмы во всех случаях, а также дополнительно через 48 ч при анализе экспрессии цитокинов. Статистический анализ проводили с использованием пакета RStudio. Значения  $p < 0.05$  считали статистически значимыми.

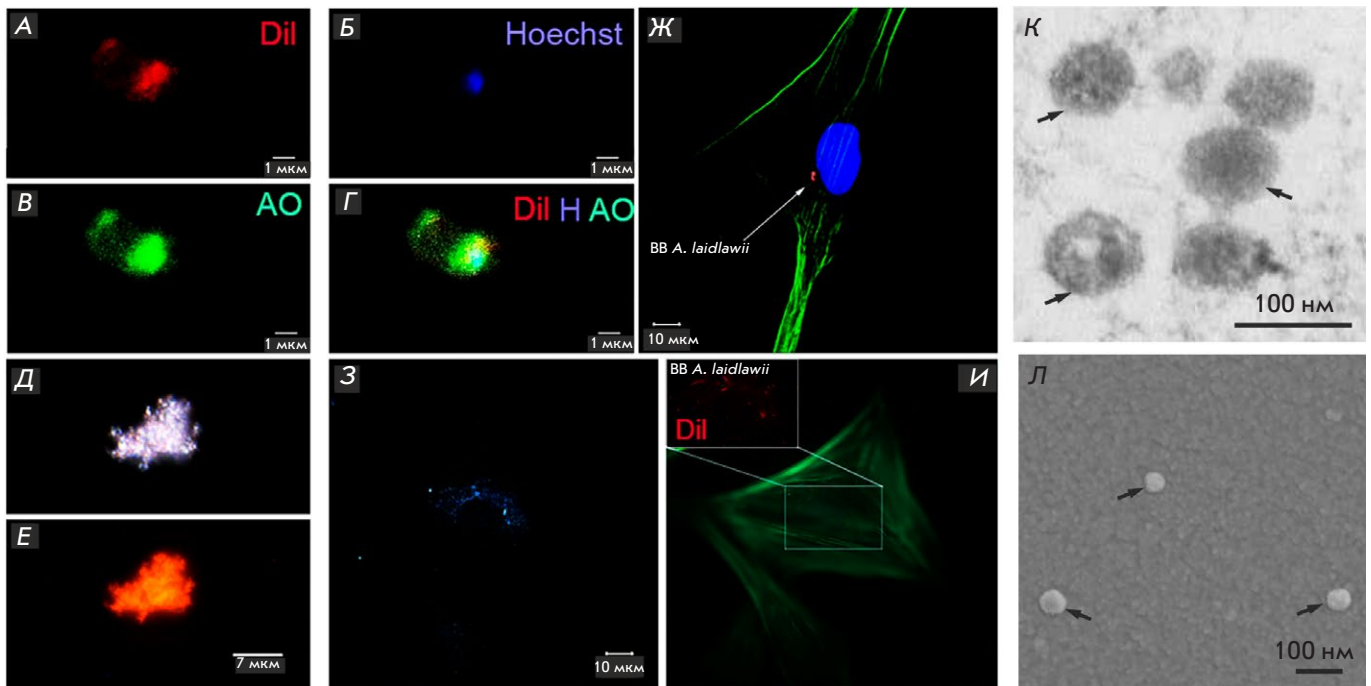
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее с помощью ПЦР и RNA-Seq нами было показано, что изолированные ВВ *A. laidlawii* PG8B содержат ДНК и РНК [9]. В данной работе установлено, что содержащие РНК ВВ *A. laidlawii* способны проникать в фибробласты кожи человека, культивируемые *in vitro*: ВВ микоплазмы обнаруживаются как в цитоплазме, так и в ядре эукариотических клеток при их совместном инкубировании. На *рис. 1Ж–И* показаны ВВ *A. laidlawii*, визуализируемые внутри клеток эукариот; на *рис. 1К, Л* представлены фотографии изолированных ВВ *A. laidlawii*, полученные с помощью трансмиссивной электронной и сканирующей микроскопии соответственно; на *рис. 2* – детекции ДНК *A. laidlawii* в фибробластах с помощью ПЦР.

Использование разных флуоресцентных красителей позволяет визуализировать ДНК (Hoechst) и РНК (акридиновый оранжевый), а также мембранные липиды (DiI) ВВ *A. laidlawii* (*рис. 1А–В*). Если объект имеет и липидную мембрану, и ДНК, и РНК, то при совмещении соответствующих фотографий регистрируется характерное изменение цветового сигнала, обусловленное наложением флуоресценции, что и наблюдается в случае ВВ микоплазмы (*рис. 1Г*).

Поскольку размеры везикул у *A. laidlawii* (диаметр большинства менее 120 нм) не позволяют визуализировать отдельные везикулы с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии, для анализа везикулярных препаратов мы использовали также варианты микроскопии более высокого разрешения. Так, изображения ВВ *A. laidlawii* получены нами с помощью трансмиссивной электронной (*рис. 1К*) и сканирующей (*рис. 1Л*) микроскопии. Индивидуальные везикулы имеют характерную морфологию. Они представляют собой сферические, окруженные мембраной наноструктуры, размер которых варьирует от 30 до 120 нм.

При использовании темнопольной флуоресцентной микроскопии везикулы микоплазмы регистрируются в виде агрегатов (*рис. 1Д, Е*). Аналогичные изображения получены и для ВВ *Pseudomonas aeruginosa* [10] – окрашенные флуоресцентными красителями (DiO и EdU) изолированные и интернализированные эпителиальными клетками легких A549 ВВ этой бактерии визуализировались при использовании конфокальной лазерной сканирующей



**Рис. 1.** Взаимодействие фибробластов кожи человека с ВВ *A. laidlawii*. Визуализация изолированных ВВ *A. laidlawii* (А–Е, К, Л) и инкубированных с HSF (Ж–И). Конфокальная лазерная микроскопия (А–Г, Ж): А – трейсер Dil (окрашивание липидов везикул, красный цвет); Б – Hoechst (окрашивание ДНК везикул, синий цвет); В – акридиноновый оранжевый (АО) (окрашивание РНК везикул, зеленый цвет); Г – совмещенная микрофотография (Dil, Hoechst, АО). Темнопольная (Д, З) и флуоресцентная (Е, И) микроскопия: (Д) агрегат везикул в темном поле и (Е) при флуоресценции трейсера Dil; Ж – флуоресценция ВВ *A. laidlawii*, окрашенных Dil (красный цвет), в полости HSF. Ядро клеток окрашено DAPI, актиновые филаменты – антителами, конъюгированными с красителем Alexa Fluor 488 (зеленый цвет); З – ВВ *A. laidlawii* в полости HSF в темном поле и при флуоресценции трейсера Dil (И), актиновые филаменты HSF окрашены антителами, конъюгированными с красителем Alexa Fluor 488 (зеленый цвет). Трансмиссивная электронная (К) и сканирующая (Л) микроскопия ВВ *A. laidlawii* (стрелки показывают индивидуальные везикулы)

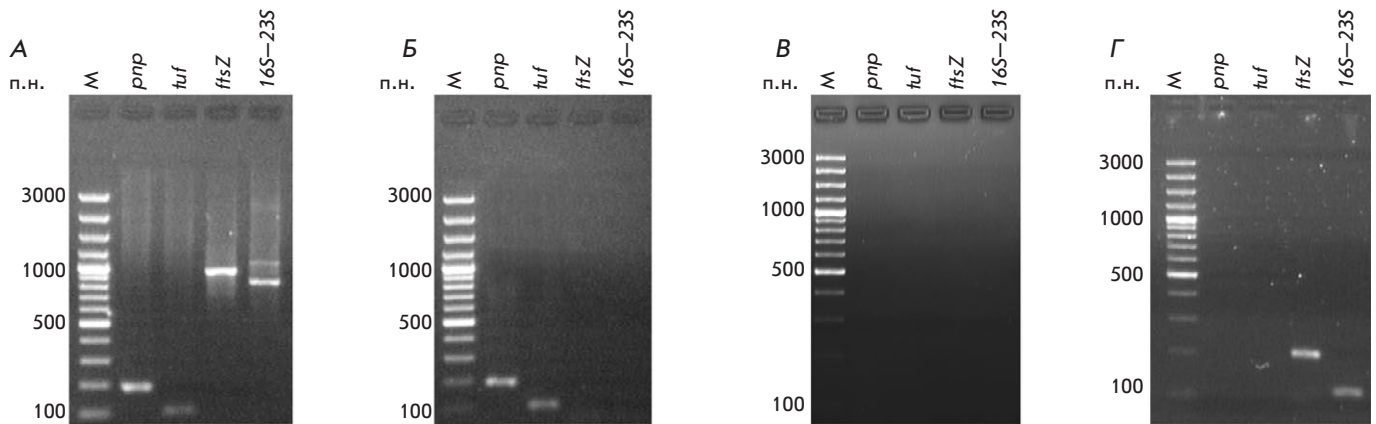
микроскопии в виде скоплений. Это может быть связано с наложением эмиссии используемых красителей от индивидуальных объектов, расположенных рядом друг с другом. Связано ли это также и с особенностями путей интернализации бактериальных ВВ, еще предстоит выяснить.

Короткие РНК бактерий в везикулах могут функционировать как эукариотические микроРНК и подавлять трансляцию за счет связывания с мРНК-мишенями [11]. Это предположение верифицировано в модельных экспериментах с содержащимися в везикулах *P. aeruginosa* короткими РНК, гомологичными тРНК<sup>Met</sup>. Взаимодействие соответствующих везикулярных РНК бактерий приводило к подавлению экспрессии ИЛ-8 и угнетению врожденного звена иммунного ответа, способствующее персистенции микроорганизмов. Ранее мы показали, что ВВ *A. laidlawii* также содержат короткие РНК, в том числе гомологичные тРНК<sup>Met</sup> [9]. Однако достоверные изменения в экспрессии ИЛ-8, а также другого

критичного провоспалительного цитокина – ИЛ-6 – при заражении HSF везикулами микоплазмы в настоящем исследовании не обнаружены ( $22.71 \pm 0.89$  и  $19.69 \pm 2.86$  пг/мл в контроле и опыте для ИЛ-8,  $p < 0.05$ ;  $11.14 \pm 0.22$  и  $11.42 \pm 0.78$  пг/мл в контроле и опыте для ИЛ-6,  $p < 0.05$ ).

Время и уровень изменения экспрессии цитокинов могут существенно варьировать в зависимости от среды, клеточной линии, бактериального штамма, продуцирующего везикулы, количественного соотношения эукариотических клеток и бактериальных везикул. Времязависимая реакция фибробластов человека на интернализацию *A. laidlawii* и экспрессия цитокинов при этом практически не изучены. Известна только одна работа [12], посвященная анализу времязависимого изменения транскриптомного профиля клеток человека (HeLa) при интернализации и персистенции клеток микоплазмы (*Mycoplasma hominis*). В этой работе выявлены значимые изменения экспрессии генов ци-





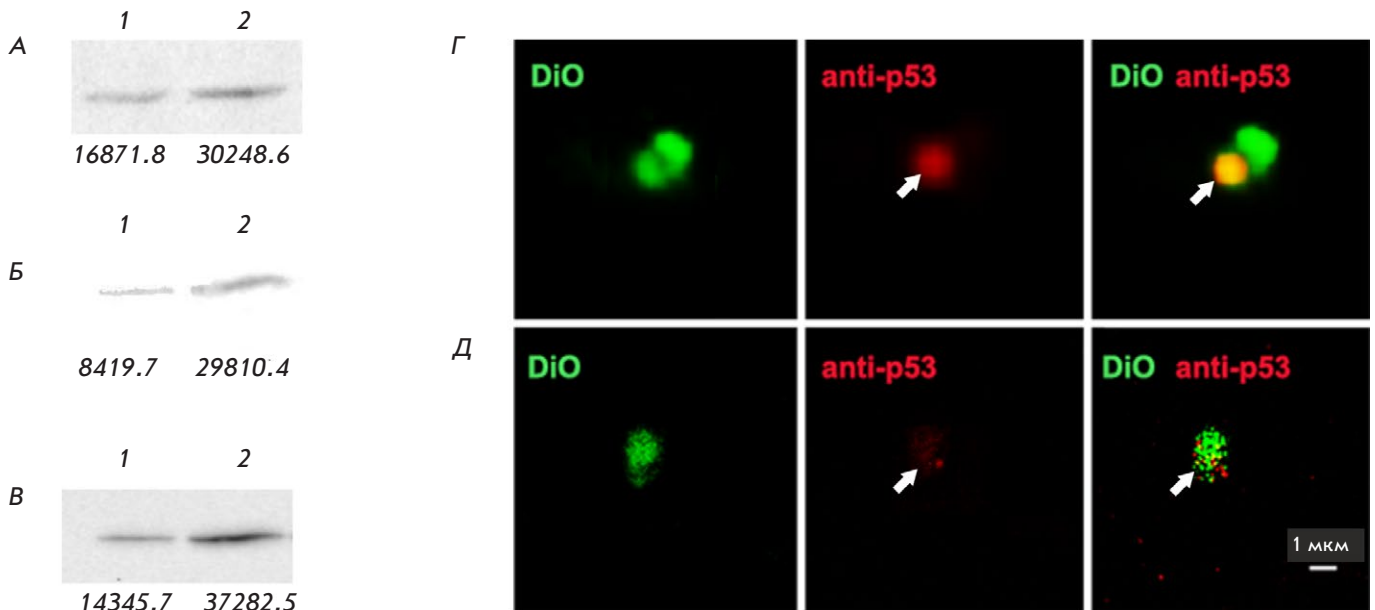
**Рис. 2.** Детекция ДНК *A. laidlawii* в ВВ микоплазмы и HSF с помощью ПЦР. ДНК экстрагирована из клеток *A. laidlawii* (А), ВВ *A. laidlawii* (Б), фибробластов (HSF), инкубированных без/с ВВ *A. laidlawii* (В, Г соответственно). М – маркер длин ДНК. В ПЦР использовали праймеры, специфичные к нуклеотидным последовательностям генов *pnp*, *tuf*, *ftsZ* (кодирующих полирибонуклеотид-нуклеотидилтрансферазу, фактор элонгации Tu, белок деления клетки FtsZ соответственно), а также спейсерному региону 16S–23S рРНК *A. laidlawii*

токинов через 4 и 48 ч после начала совместной инкубации бактериальных и эукариотических клеток: и в том, и в другом случае в стресс-реактивном пуле оказался ген *ИЛ-6*, но не *ИЛ-8*. В этой связи мы проанализировали образцы не только через 4 ч, но также через 48 ч от начала совместной инкубации ВВ микоплазмы и HSF. Обнаружено статистически значимое изменение экспрессии *ИЛ-6* ( $6.42 \pm 0.6$  и  $5.13 \pm 0.28$  пг/мл в контроле и опыте соответственно;  $p < 0.05$ ), но не *ИЛ-8* ( $8.59 \pm 3.23$  и  $17.64 \pm 5.88$  пг/мл в контроле и опыте соответственно;  $p < 0.05$ ). Полученные нами данные указывают на различия в молекулярных механизмах индукции иммунокомпромисса у микоплазм и классических бактерий.

Толерантность врожденного звена иммунитета, ассоциированная с отсутствием оперативной модуляции экспрессии провоспалительных цитокинов (*ИЛ-6* и *ИЛ-8*), не отменяет клеточную реактивность на инфекционный агент – молекулярную сигнатуру заражения можно выявить с помощью современных методов высокого разрешения, в том числе вариантов иммунной электронной микроскопии, а также омикс-профилирования [13]. В результате применения комбинации 2D-DIGE и MALDI-TOF/TOF – технологии протеомного анализа, основанной на использовании двумерного гель-электрофореза полипептидов, окрашенных разными (в контроле и опыте соответственно) флуоресцентными красителями, и последующей идентификации дифференциально представленных белков с помощью MALDI-TOF/TOF и программы Mascot в режиме Peptide Mass Fingerprint, а так-

же инструмента функциональной аннотации DAVID, нами установлено, что заражение HSF внеклеточными везикулами *A. laidlawii* приводит к модуляции протеома фибробластов – изменение представленности белков регистрируется через 4 ч после начала инкубации ВВ микоплазмы с эукариотическими клетками, т.е. когда изменение секреции цитокинов *ИЛ-6* и *ИЛ-8* не обнаруживается. Дифференциально экспрессируемые белки фибробластов (депонированы нами в базу данных ProteomeXchange, № PXD027040) участвуют в фолдинге, формировании цитоскелета, биогенезе ВВ (экзосомы и микровезикулы), иммунореактивности и пролиферации клеток. Большинство идентифицированных белков являются стресс-реактивными, они могут участвовать в клеточном ответе на бактериальные и/или вирусные инфекции [14]. Среди них оказались белки, связанные как с позитивной, так и с негативной регуляцией апоптоза (*TERA*, *LEG1* и *ENPL*, *CH60*, *ANXA5*, *GRP78*, *HSPB1*, *CRYAB* соответственно).

Известные ограничения варианта протеомного анализа 2D-DIGE и MALDI-TOF/TOF (низкокопийные белки не визуализируются при окрашивании гелей, высококопийные белки накладываются и «скрывают» расположенные рядом пятна, сильнощелочные белки плохо изоэлектрофокусируются, высокомолекулярные белки не проходят через поры используемых гелей, низкомолекулярные белки не могут быть эффективно разделены, гидрофобные белки не растворяются в используемом буфере), в том числе в отношении выявления пула дифференциально экспрессированных белков в эукариотической клетке (соотношение визуализируемого,



**Рис. 3.** Детекция белков в фибробластах кожи человека с помощью Вестерн-блоттинга (А–В) и p53 в микровезикулах фибробластов с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (Г, Д). Вестерн-блоттинг белков фибробластов с антителами к β-актину (А), p53 (Б) и HSP7C (В). Дорожки 1 и 2 – белки фибробластов, инкубированных без/с BB A. *laidlawii* соответственно. Интенсивность полос определена с помощью ImageJ и указана под дорожками. Белок p53 в микровезикулах, продуцируемых фибробластами кожи человека, инкубированными с (Г) и без (Д) BB A. *laidlawii*. Стрелки указывают на сигнал p53

анализируемого, репортируемого и теоретического протеомов существенно отстоит от соотношения в клетках бактерий с маленьким геномом – оптимального для соответствующих исследований) [15, 16], определяют пределы его возможностей – далеко не все белки, дифференциально экспрессирующиеся в эукариотической клетке, могут быть обнаружены при использовании глобального протеомного профилирования. В этой связи для оценки экспрессии актуальных конкретных белков, не вошедших в выявленный стресс-реактивный пул, необходимо проводить дополнительный таргетный анализ, например, с помощью Вестерн-блоттинга, который рекомендуется использовать и для валидации данных глобального протеомного профилирования [17]. Поскольку в пуле идентифицированных белков не оказалось p53 – ключевого игрока исхода про- и антиапоптотических процессов [18], нами проведен таргетный анализ представленности этого белка в фибробластах, а также в секретлируемых фибробластами внеклеточных везикулах (рис. 3). Согласно полученным данным, заражение фибробластов кожи человека везикулами *A. laidlawii* приводит к увеличению количества p53 в клетках и не подавляет его секрецию – p53 обнаруживается

во внеклеточных везикулах фибробластов как контрольных, так и опытных образцов.

Внеклеточные везикулы эукариот включают разные группы секретлируемых во внеклеточное пространство везикул, которые различаются по функциям, размеру, составу и биогенезу – экзосомы, микровезикулы, апоптотические тельца. Микровезикулы образуются при выпячивании плазматической мембраны; диаметр этих структур составляет 100–1000 нм, а плотность 1.25–1.30 г/мл. Апоптотические тельца высвобождаются из плазматической мембраны клеток на поздней стадии апоптоза; диаметр этих структур равен 1–5 мкм, а плотность – 1.18–1.28 г/мл. Экзосомы образуются внутри клеток из поздних эндосом, называемых мультивезикулярными тельцами (при слиянии поздней эндосомы с плазмалеммой экзосомы оказываются за пределами клетки); диаметр этих структур составляет 30–150 нм, а плотность – 1.13–1.21 г/мл [19, 20]. Разница размеров и плотности везикул соответствующих групп определяет относительные возможности их дифференциации: апоптотические тельца можно отличить от более мелких по размеру ВВ (экзосом и микровезикул) с помощью микроскопии, а экзосомы и микровезикулы, благода-

ря разнице в размерах и плотности, разделяются на стадии ультрацентрифугирования и ультрацентрифугирования в градиенте плотности Optiprep. При использованном в нашей работе режиме центрифугирования экзосомы не осаждаются на дно пробирки, а в градиенте плотности находятся выше, чем микровезикулы. Визуализация образцов с помощью микроскопии высокого разрешения позволяет определить размеры структур. Структуры, соответствующие по размерам апоптотическим тельцам, в наших препаратах не были обнаружены – диаметр индивидуальных везикул, выделенных из эукариотических клеток, в исследованных образцах оказался в пределах 200–800 нм, что указывает на возможность их принадлежности к группе микровезикул.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что ВВ *A. laidlawii* – убиквитарной микоплазмы – основного контаминанта клеточных

культур, способны проникать в эукариотические клетки *in vitro* и модулировать клеточный протеом. Молекулярные механизмы взаимодействия везикул микоплазмы с клетками эукариот и вклад соответствующих наноструктур в молекулярную машинерию клеточной перmissивности еще предстоит выяснить. Выяснение этих механизмов важно как для фундаментальных исследований простейших прокариот, так и практических разработок контроля гипермутабельных бактерий, инфицирующих человека, животных и растения, контаминирующих клеточные культуры и вакцинные препараты. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ФИЦ Казанского научного центра РАН. Авторы выражают благодарность зав. лабораторией защитных механизмов клетки Института цитологии РАН д.б.н. И.В. Гужовой за помощь в проведении таргетного анализа белков.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Browning G., Citti C. Mollicutes: molecular biology and pathogenesis. Caister: Acad. Press, 2014. 333 p.
- Munhoz da Rocha I.F., Amatuzzi R.F., Lucena A.C.R., Faoro H., Alves L.R. // Front. Cell Infect. Microbiol. 2020. V. 10. P. 593160.
- Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Medvedeva E.S., Grygorieva T.Yu., Trushin M.V., Vishnyakov I.E., Sabantsev A.V., Borchsenius S.N., Chernova O.A. // J. Proteomics. 2014. V. 110. P. 117–128.
- Gaurivaud P., Ganter S., Villard A., Manso-Silvan L., Chevret D., Boulé C., Monnet V., Tardy F. // PLoS One. 2018. V. 13. e0208160.
- Iwai K., Minamisawa T., Suga K., Yajima Y., Shiba K. // J. Extracell. Vesicles. 2016. V. 5. P. 30829.
- Mouzykantov A.A., Medvedeva E.S., Baranova N.B., Chernova O.A., Chernov V.M. // Data Brief. 2020. V. 32. P. 106049.
- Akhatova F., Danilushkina A., Kuku G., Saricam M., Culha M., Fakhrullin R. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 2018. V. 91. № 11. P. 1640–1645.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Medvedeva E.S., Mouzykantov A.A., Ponomareva A.A., Shaymardanova G.F., Gorshkov O.V., Trushin M.V. // J. Proteomics. 2011. V. 74. № 12. P. 2920–2936.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Medvedeva E.S., Baranova N.B., Malygina T.Y., Aminov R.I., Trushin M.V. // FEMS Microbiol. Lett. 2018. V. 365. № 18. P. 185.
- Bitto N.J., Chapman R., Pidot S., Costin A., Lo C., Choi J., D’Cruze T., Reynolds E.C., Dashper S.G., Turnbull L., et al. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 7072.
- Koeppen K., Hampton T.H., Jarek M., Scharfe M., Gerber S.A., Mielcarz D.W., Demers E.G., Dolben E.L., Hammond J.H., Hogan D.A., et al. // PLoS Pathog. 2016. V. 12. e1005672.
- Hopfe M., Deenen R., Degrandi D., Köhrer K., Henrich B. // PLoS One. 2013. V. 8. e54219.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Lopukhov L.L., Aminov R.I. // Expert Opin. Drug Discov. 2019. V. 14. № 5. P. 455–468.
- Wan Q., Song D., Li H., He M.L. // Signal Transduct. Target Ther. 2020. V. 5. № 1. P. 125.
- Westermeier R., Naven T. Proteomics in Practice. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- Wasinger V.C., Pollack J.D., Humphery-Smith I. // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 1571–1582.
- Poli G., Ceni E., Armignacco R., Ercolino T., Canu L., Baroni G., Nesi G., Galli A., Mannelli M., Luconi M. // Oncotarget. 2015. V. 6. P. 5695–5706.
- Aubrey B.J., Kelly G.L., Janic A., Herold M.J., Strasser A. // Cell Death Differ. 2018. V. 25. № 1. P. 104–113.
- Cesselli D., Parisse P., Aleksova A., Veneziano C., Cervellin C., Zanello A., Beltrami A.P. // Front. Physiol. 2018. V. 9. P. 1394.
- Zhang Y., Liu Y., Liu H., Tang W.H. // Cell Biosci. 2019. V. 9. P. 19.