

БЕЛОК ТЕПЛОВОГО ШОКА α -КРИСТАЛЛИНОВОГО ТИПА ИЗ МИКОПЛАЗМЫ (*ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*)

**© С. Н. Борхсениус,^{1,*} И. Е. Вишняков,¹ Е. В. Буданицева,¹
М. С. Вонский,¹ Е. Якобс,² В. Н. Лазарев³**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

² Институт медицинской микробиологии и гигиены, D-01307 Дрезден, Германия,

и ³ Научно-исследовательский институт физико-химической медицины

Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, Москва;

электронный адрес: *borch@mail.cytspb.rssi.ru

Выявлено значительное увеличение количества основных белков теплового шока (БТШ) в клетках *Acholeplasma laidlawii* после теплового воздействия на клетки в жидкой культуре, причем количество малого БТШ, названного нами р17, увеличивалось в сотни раз. Белок р17 выделен и идентифицирован как БТШ α -криSTALLинового типа (α -БТШ) в результате сиквенса 15 аминокислот с N-конца его полипептидной цепи, последующего нахождения соответствующей открытой рамки считывания (ОРФ) в полностью прочтенному геноме *A. laidlawii* PG 8A и компьютерного поиска гомологичных ОРФ во всех 17 геномах микоплазм, секвенированных к настоящему времени. Установлено, что гены, кодирующие α -БТШ, отсутствуют в генах всех изученных представителей класса Mollicutes (микоплазмы), за исключением исследованной нами ахолеплазмы и двух видов *Phytoplasma*. Предполагается, что наличие или отсутствие α -БТШ у микроорганизма может быть связано с тем, что представители семейств *Acholeplasmataceae* и *Phytoplasmataceae* обитают главным образом в тканях растений в отличие от большинства микоплазм семейства *Mycoplasmataceae*, населяющих ткани животных и человека, т. е. использующих экологические ниши с относительно постоянной температурой.

Ключевые слова: микоплазмы, белки теплового шока, α -БТШ, биоинформатика.

Принятые сокращения: БТШ — белки теплового шока, α -БТШ — белки теплового шока α -криSTALLинового типа, ДДС — додецилсульфат натрия, ПААГ — полиакриламидный гель, PPLO — «Pleuro-Pneumonia Like Organism» — устаревшее обозначение микоплазм как организмов, подобных вызывающим плевропневмонию крупного рогатого скота.

Давно известно, что при подъеме температуры до сублетальных значений клетки в культуре и целые организмы приостанавливают синтез большинства обычных белков и увеличивают скорость синтеза особого набора белков, называемых белками теплового шока (БТШ). БТШ были обнаружены у многих эукариот и бактерий (Lindquist, 1966). Микоплазмы не составили исключения. БТШ микоплазм впервые были выявлены в нашей лаборатории. Было показано, что при увеличении температуры культуральной среды с 32 до 44 °C на 2 ч клетки *Acholeplasma laidlawii* ускоряют синтез около десяти полипептидов на фоне подавления синтеза остальных белков, причем в наибольшей степени возрастает количество полипептидов с мол. массами 72, 65, 17 и 10 кДа (Borchsenius et al., 1990). Наличие БТШ у микоплазм, при том что геномы этих микроорганизмов значительно редуцированы, указывает на фундаментальное значение БТШ для жизнеобеспечения клетки, в том числе «минимальной». Синтез БТШ у ряда микоплазм независимо показан и другими авторами (Dascher et al., 1990).

Позже синтез БТШ у микоплазм нескольких видов был исследован нами методом иммуноблотинга с приме-

нением поликлональных антител к БТШ 70 человека и поликлональных антител к бактериальным белкам GroEL и GroES. При этом полипептиды, синтезируемые клетками *A. laidlawii*, с мол. массой 72 кДа были идентифицированы как шапероны DnaK (бактериальный аналог БТШ 70 человека), а полипептиды с мол. массами 65 и 10 кДа — как аналоги известных бактериальных шаперонов GroEL и GroES соответственно (Вонский и др., 1993; Вонский, 2001). Ген, кодирующий DnaK *A. laidlawii*, был секвенирован (Вонский и др., 1998).

В данной работе мы продолжили изучение БТШ *A. laidlawii* с целью идентификации полипептида р17, который в соответствии с молекулярной массой может быть отнесен к семейству малых БТШ (мБТШ).

Известно, что размер полипептидной цепи мБТШ у разных организмов варьирует от 10 до 43 кДа, причем большинство из них — от 14 до 27 кДа. Значительная часть белков этого семейства у архей, бактерий и эукариот содержит центральный консервативный участок, так называемый α -криSTALLиновый домен, и обладает шаперонной активностью. Малые БТШ, содержащие α -криSTALLиновый домен, названы α -БТШ (De Jong et al., 1998),

и шаперонные функции белков этого семейства хорошо изучены, особенно у бактерий (Richmond et al., 1999; Nahrberhaus, 2002). В связи с этим представлялось интересным выяснить, содержит ли полипептид p17 *A. laidlawii* α -кристаллический домен и располагают ли подобными структурами белки микоплазм других видов.

Материал и методика

В работе использован штамм микоплазмы *Acholeplasma laidlawii* PG8A из коллекции Отдела клеточных культур Института цитологии РАН. Культивирование проводили на модифицированной жидкой среде PPLO (Chanock et al., 1961) с добавлением 10 % лошадиной сыворотки (Sigma) и на синтетической среде (Rodwell, 1983). Синтез БТШ в клетках микоплазм индуцировали переносом культуры, выращенной при 32 °C до середины экспоненциальной фазы роста ($OD_{610} = 0.1$, около 108 КОЕ/мл), в условия повышенной температуры (39 или 44 °C) на 90 мин. Для быстрого изменения температуры в этих экспериментах микоплазмы выращивали в объеме 5 мл и ставили тепловой шок в водяной бане. Через 90 мин культуру микоплазмы переносили на 37 °C и продолжали культивирование еще 90 мин. Такой режим теплового шока обеспечивал максимальное накопление БТШ в клетках. Микоплазмы собирали центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 15 мин.

Введение метки в синтезируемые при тепловом шоке белки проводили, добавляя к культуре микоплазм, выращиваемой на синтетической среде, ^{35}S -метионин (уд. акт. 11 ПБк/моль; ГИПХ, Санкт-Петербург) в количестве 2 МБк на 1 мл среды после переноса культуры на 44 °C. Несмотря на то что рост микоплазм на синтетической среде замедлен по сравнению с ростом на среде PPLO, синтетическая среда обеспечивала лучшее включение метионина в новосинтезированные белки. Инкубацию продолжали 30 мин, после чего синтез белков останавливали добавлением хлорамфеникола до концентрации 200 мкг/мл и охлаждали культуру на ледяной бане. Клетки собирали центрифугированием и отмывали от свободного ^{35}S -метионина раствором PBS (1×).

Электрофорез белковых препаратов проводили в 12%-ном ДДС-ПААГ со ступенчатой буферной системой по Лэммли (Laemmli, 1970) и окраской Coomassie R250 (Sigma).

Синтезированные в процессе теплового шока ^{35}S -меченные полипептиды выявляли методом радиоавтомографии, экспонируя высушенные гели с пленкой Hyperfilm (Amersham) 48 ч.

Полипептид p17 переносили (электроперенос) на мембрану Immobilon-P (Millipore), после чего N-концевой сиквенс был выполнен на автоматическом аминокислотном анализаторе в Институте медицинской микробиологии и гигиены Университета г. Фрайбург (Германия).

Компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей включал в себя поиск гомологичных последовательностей в базах данных EMBL, GenBank и SWISS-PROT с помощью программ BLAST и PROSITE, а также проведение множественного выравнивания аминокислотных последовательностей вручную на основании результатов поиска и попарного выравнивания гомологов против исследуемого белка p17 *A. laidlawii* с помощью программы BLAST.

Результаты и обсуждение

Из рис. 1, а видно, что синтез БТШ в клетках *A. laidlawii* сопровождается их накоплением. Белки p72, p65 и p17 отчетливо выявляются на электрофорограмме при окраске геля Coomassie (рис. 1, а, дорожка 4) и при радиоавтомографии (рис. 1, б, дорожка 3). Накопление БТШ делается заметным через 20 мин и достигает максимума через 1 ч после повышения температуры, причем повышенное содержание БТШ поддерживается по крайней мере 4 ч после возврата клеток к нормальной для ахолеплазм температуре культивирования (32 °C). Накопление БТШ на фоне других белков у *A. laidlawii* заметно уже при повышении температуры до 39 °C (рис. 1, б, дорожка 2). По данным денситометрии количество основных БТШ в клетках после теплового шока увеличивается для p72 с 0.8 до 4.2 %, для p65 — с 0.05 до 4.80 %, что сравнимо с накоплением БТШ в *Escherichia coli*, которое может достигать 15 % (Lo et al., 1991). Таким образом, если в нормальных условиях скорость синтеза белка в клетках *A. laidlawii* значительно меньше, чем в клетках *E. coli*, о чем можно судить по относительно низкой скорости роста культуры (Борхсениус и др., 2002), то в условиях теплового шока за то же время клетки производят сравнимые количества БТШ.

В этой части работы мы воспроизвели данные, полученные нами ранее (Вонский и др., 1993; Вонский, 2001), для того чтобы обратить особое внимание на полипептид p17. В условиях теплового шока клетки *A. laidlawii* производят большое количество низкомолекулярного полипептида p17, по данным денситометрии (рис. 1, в) достигающее 7.2 % от суммарного количества клеточного белка, при этом относительное количество этого полипептида увеличивается в сотни раз. Как следует из результатов опыта со включением метки, синтез p17 инициируется при тепловом шоке, но практически незамечен в клетках *A. laidlawii* при 32 °C (рис. 1, б).

Накопление p17, как и других БТШ, может быть подавлено добавлением хлорамфеникола в культуральную среду: инкубация клеток микоплазм после теплового шока в течение 2 ч в присутствии хлорамфеникола не изменяла картины электрофоретического распределения белков (рис. 1, а, дорожка 3). Этот результат позволяет заключить, что накопление p17 действительно связано с его синтезом, а не с деградацией (протеолизом) каких-либо более крупных полипептидов.

При оптимальных условиях роста большинство бактерий синтезирует небольшие количества малых БТШ, в том числе α -БТШ, но в условиях стресса в клетках *E. coli* количество α -БТШ может возрастать до 300 раз (Richmond et al., 1999), т. е. существенно больше, чем других БТШ. Ранее α -БТШ *E. coli* обозначали как Ibp — «Inclusion body-associated proteins», в связи с тем что эти полипептиды были найдены в тесной ассоциации с нерастворимыми включениями рекомбинантных белков в трансформированных клетках (Allen et al., 1992).

Для идентификации полипептида p17 *A. laidlawii* материал после электрофореза в геле переносили на мембрану, и последовательность 15 аминокислот с N-конца цепи была прочтена: MLSLLNKNRSFFDXF. Последовательность нуклеотидов, соответствующая этой последовательности аминокислот, была найдена в полном геноме *A. laidlawii* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Genome Project № 19259) в составе открытой рамки считывания *orf311*, но поиск гомологичных MLSLLNKNRSFFDXF последовательностей с помощью программы BLAST по всем до-

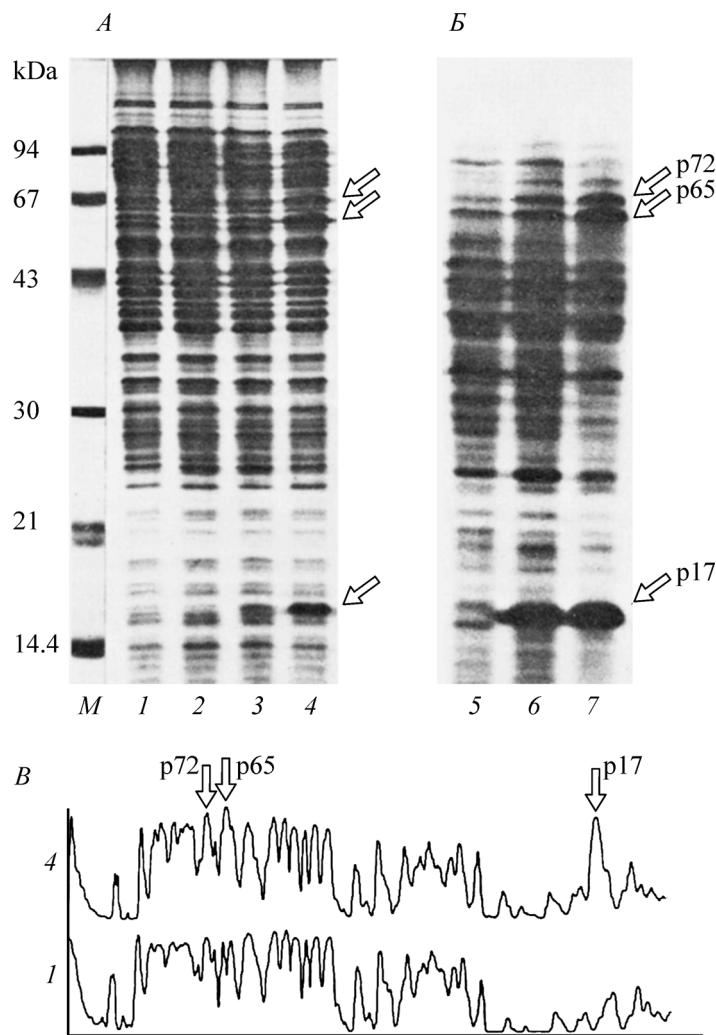


Рис. 1. Изменение белкового спектра *Acholeplasma laidlawii* при тепловом шоке.

Стрелками отмечено положение индивидуальных БТШ, количество которых в клетке возрастает после теплового шока. А — электрофорез тотального белка *A. laidlawii* в 12%-ном поликариламидном геле (ДДС-ПААГ), окраска кумаси. 1 — контроль, клетки выращены при 32 °C; 2 — то же, инкубация 2 ч в присутствии хлорамфеникола; 3 — тепловой шок (44 °C, 2 ч) в присутствии хлорамфеникола; 4 — тепловой шок (44 °C, 2 ч) с последующей радиоавтографией. ^{35}S -метионин добавляли в культуральную среду сразу после начала теплового шока и продолжали инкубацию еще 2 ч при 37 °C. 5 — контроль, клетки выращены при 32 °C; 6 — тепловой шок (39 °C, 2 ч); 7 — тепловой шок (44 °C, 2 ч). В — денситограммы дорожек 1 и 4. Молекулярные массы маркерных белков (LMW, Pharmacia) приведены слева.

ступным (DDBJ/EMBL/GenBank) к настоящему времени протеомам других микроорганизмов не дал положительного результата.

Аминокислотная последовательность полноразмерного гипотетического продукта *orf311* *A. laidlawii* была проверена (CDD BLAST) на наличие в ее составе известных консервативных доменов. При этом был выявлен домен, гомологичный cd00298, главному структурному домену всех представителей семейства малых белков теплового шока α -кристаллического типа.

Общим свойством α -БТШ прокариот и эукариот является присутствие последовательности из приблизительно 80 аминокислот, называемой α -кристаллическим доменом. Этому домену предшествует N-концевой участок, варьирующий и по длине, и по составу. Вслед за последовательностью домена располагается короткий C-концевой участок (Caspers et al., 1995).

В результате поиска (BLAST) белков, гомологичных продукту открытой рамки считываания *orf311* *A. laidlawii*, среди полностью секвенированных на сегодняшний день

геномов микроорганизмов (874 генома) было выявлено 100 гомологов со сходством последовательностей от 27 до 49 % в области консервативного α -кристаллического домена. Из этих 100 белков 83 принадлежат к семейству α -БТШ, и функция молекулярных шаперонов установлена для 20 из них. Остальные 17 аминокислотных последовательностей обозначены как «гипотетические белки», т. е. вероятные продукты открытых рамок считываания, для которых функция на основании компьютерного анализа пока не установлена.

На рис. 2 представлено сравнение аминокислотной последовательности полипептида p17 *A. laidlawii* с последовательностями α -БТШ 5 выбранных нами эубактерий и археи *Methanococcus jannaschii*. Исходя из полученных данных с большой вероятностью следует вывод о том, что исследуемый нами белок p17 является малым белком теплового шока и принадлежит к семейству α -БТШ.

Поиск генов и белков, гомологичных открытой рамке считываания *orf311* *A. laidlawii* и ее гипотетическому про-

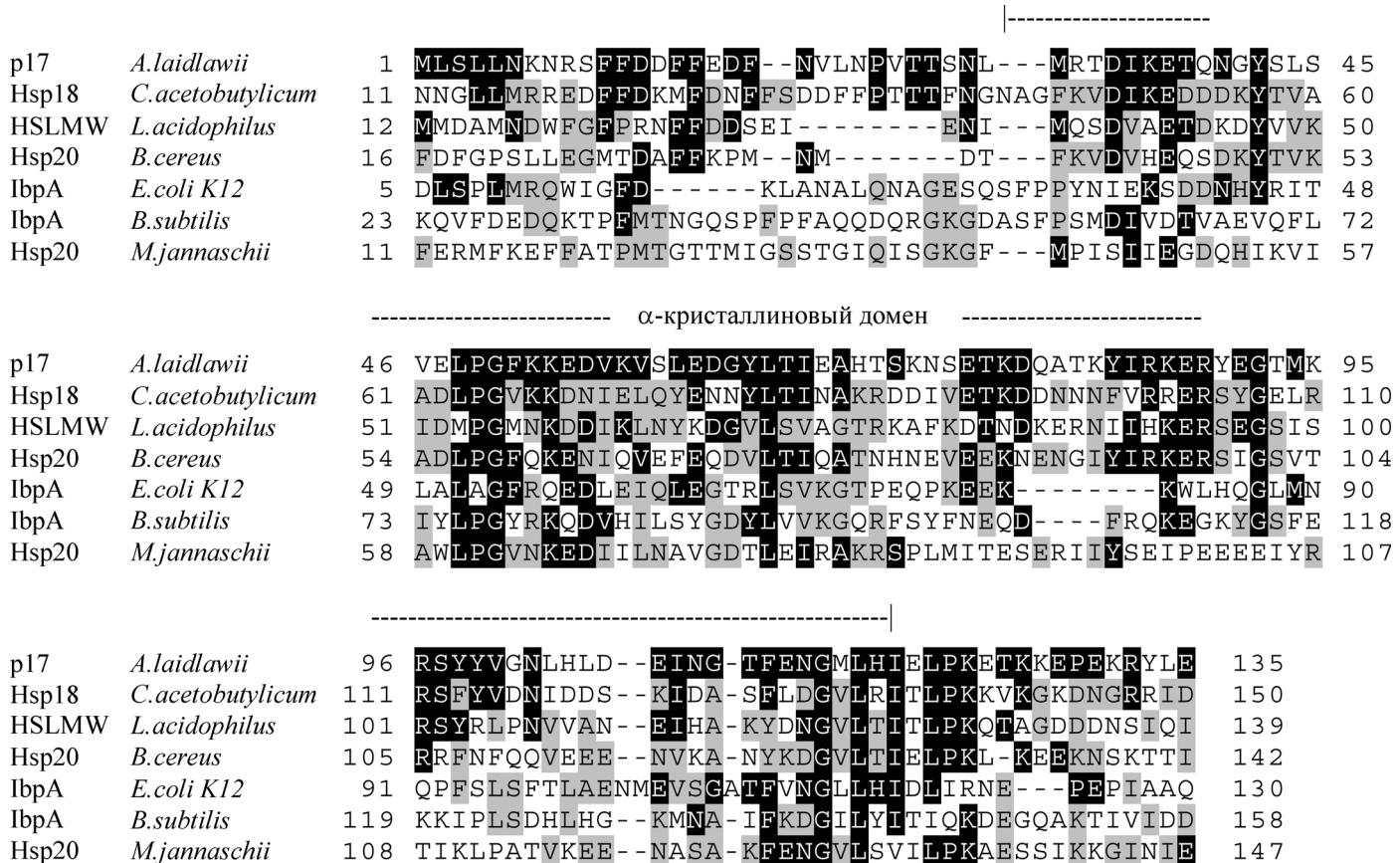


Рис. 2. Сравнение аминокислотной последовательности полипептида p17 *Acholeplasma laidlawii* с последовательностями α-БТШ 5 эубактерий и археи *Methanococcus jannaschii*.

дукту, был отдельно выполнен во всех 17 полностью секвенированных к настоящему времени геномах микоплазм, представленных в GenBank: *Aster yellows witches'-broom phytoplasma* (AYWB) (№ CP000061), *Mycoplasma florum L1* (№ AE017263), *Mycoplasma agalactiae* PG2 (№ CU179680), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* ATCC 27343 (№ CP000123), *Mycoplasma gallisepticum R* (№ AE015450), *Mycoplasma genitalium G37* (№ L43967), *Mycoplasma hyopneumoniae* 232 (№ AE017332), *Mycoplas-*

ma hyopneumoniae 7448 (№ AE017244), *Mycoplasma hyopneumoniae J* (№ AE017243), *Mycoplasma mobile* 163K (№ AE017308), *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC str. PG1 (№ BX293980), *Mycoplasma penetrans* HF-2 (№ BA000026), *Mycoplasma pneumoniae* M129 (№ U00089), *Mycoplasma pulmonis* UAB CTIP (№ AL445566), *Mycoplasma synoviae* 53 (№ AE017245), *Onion yellows phytoplasma* (OY-M) (№ AP006628), *Ureaplasma parvum* serovar 3 str. ATCC 700970 (№ AF222894).



Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей α-БТШ микоплазм: полипептида p17 *Acholeplasma laidlawii* и шаперонов IbpA двух фитоплазм — *Aster yellows witches'-broom phytoplasma* (AYWB) и *Onion yellows phytoplasma* (OY-M).

Были обнаружены всего два белка, называемых IbpA, обладающих сходством 44 и 45 % с продуктом рамки считываивания *orf311 A. laidlawii* (рис. 3). Оба эти белка принадлежат фитоплазмам *OY-M* и *AYWB* соответственно и, по мнению авторов, выполняют функции молекулярных шаперонов (Oshima et al., 2004; Bai et al., 2006). Фитоплазмы до недавнего времени относили к микоплазма-подобным организмам (MLO — Mycoplasma Like Organisms) без определенного филогенетического статуса. Только с развитием секвенирования геномов становится ясно, что фитоплазмы следует относить к классу Mollicutes и что среди всех микоплазм они состоят в наиболее близком родстве с семейством *Acholeplasmataceae* и, в частности, с *A. laidlawii* (Kuske, Kirkpatrick, 1992).

Известно, что уровень гомологии между α -БТШ бактерий разных видов ниже такового шаперонов других классов (Caspers et al., 1995). Поэтому неудивительно, что полипептид из 15 аминокислотных остатков, прочтенный нами с N-конца p17 *A. laidlawii*, оказался уникальным. Из сравнения приведенных на рис. 3 аминокислотных последовательностей следует, что белок p17, или α -БТШ, *A. laidlawii* обладает значительным сходством с шаперонами IbpA двух фитоплазм. Все три сравниваемых полипептида имеют в своем составе характерный α -кристаллический домен, свойственный α -БТШ. На основании этого в добавление к его суперпродукции в условиях теплового шока мы заключаем, что белок p17 в клетках *A. laidlawii*, вероятно, также выполняет функцию шаперона. Таким образом, α -БТШ выявлены лишь у трех представителей класса микоплазм (Mollicutes) и, очевидно, отсутствуют у остальных изученных микоплазм.

Возникает вопрос: почему у одних представителей класса Mollicutes α -БТШ имеются, а у других нет? Можно было бы предположить, что α -БТШ у большинства микоплазм отсутствуют в связи с более значительной степенью редукции их геномов. Однако гены, кодирующие α -БТШ, не найдены не только у *M. genitalium*, известной своим самым маленьким геномом (0.58 Мб) среди организмов, способных к самостоятельному воспроизведению (Fraser et al., 1995), но и у *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC str. PG1 (Westberg et al., 2004) и *Mycoplasma penetrans* HF-2 (Sasaki et al., 2002) с геномами 1.20 и 1.36 Мб соответственно. В геноме (1 Мб) внутриклеточного паразита *Chlamydia trachomatis* (Stephens et al., 1998) α -БТШ также отсутствуют. В то же время в маленьких геномах внутриклеточных паразитов *Buchnera aphidicola* strain APS (0.64 Мб) и *Rickettsia prowazekii* (1.1 Мб), обитающих большую часть жизненного цикла на пойкилтермных насекомых, гены, кодирующие α -БТШ, обнаружены (Andersson, 1998; Shigenobu, 2000). Представляется вероятным, что для наличия или отсутствия α -БТШ решающее значение имеет не размер генома, а температурный режим существования организма. Так, все известные к настоящему времени микроорганизмы, у которых α -БТШ отсутствуют, в том числе большинство микоплазм, являются паразитами животных и человека и, таким образом, занимают изотермические ниши. Но представители семейств *Phytoplasmataceae* и *Acholeplasmataceae*, относящиеся к классу Mollicutes, в отличие от большинства других микоплазм обитают главным образом в тканях растений.

Шаперонная активность α -БТШ заключается в присоединении к новосинтезированным полипептидным цепям, которые еще не приняли законченную пространственную структуру, и в препятствовании их необратимой агрегации. В условиях стресса, в частности при

повышении температуры, α -БТШ присоединяются к полипептидным цепям, предотвращая их денатурацию. Предполагают, что α -БТШ, определяющий первую фазу шаперонной активности, не требует гидролиза АТФ в отличие от большинства других шаперонов (Jakob et al., 1993). Но следующая фаза — освобождение из комплекса и перевод «курируемого» белка в нативное состояние, т. е. собственно фолдинг, или рефолдинг, требует взаимодействия с другими клеточными шаперонами. Таким образом, α -БТШ интегрированы в мультишаперонную сеть, осуществляющую строгий контроль качества белков в клетке (Narberhaus, 2002; Wong, Houry, 2004). Кроме того, α -БТШ, вероятно, играют важную роль в регуляции текучести клеточной мембрани, способны стабилизировать жидкокристаллическое состояние бислоя и предохранять целостность мембрани во время термических флуктуаций (Horváth et al., 1998; Tsvetkova et al., 2002).

Исходно α -кристаллинами были названы белки хрусталика глаза млекопитающих, от которых зависит прозрачность хрусталика (Reznik, 1957). Позднее подобные белки были найдены во множестве других тканей млекопитающих и у многих, но не у всех бактерий, животных, растений и нескольких из исследованных представителей архей. Для большинства членов обширного семейства α -кристаллинов характерны по крайней мере три общих свойства: 1) присутствие α -кристаллического домена; 2) способность к образованию олигомеров, включающих в себя до 24 мономеров — субъединиц; 3) шаперонная активность олигомерной формы (Narberhaus, 2002).

Образуют ли подобные олигомеры исследуемые нами α -БТШ *A. laidlawii* и какова их локализация в клетках ахолеплазмы, еще предстоит проверить.

Список литературы

- Борхсенius С. Н., Чернова О. А., Чернов В. М., Вонский М. С. 2002. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика. СПб.: Наука. 319 с.
- Вонский М. С. 2001. Белки теплового шока микоплазм: клонирование и экспрессия гена *dnaK*: Дис. ... канд. бiol. наук. СПб. 121 с.
- Вонский М. С., Астафатурянц Г. В., Борхсенius С. Н. 1993. Экспрессия белков теплового шока у микоплазм. Докл. РАН. 331 (1) : 112—115.
- Вонский М. С., Усокин Д. Г., Борхсенius С. Н. 1998. Гены *dnaK* как основа для филогенетического анализа микоплазм. Докл. РАН. 359 (2) : 270—273.
- Allen S. P., Polazzi J. O., Gierse J. K., Easton A. M. 1992. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 174 : 6938—6947.
- Andersson S. G., Zomorodipour A., Andersson J. O., Sicheritz-Pontén T., Alsmark U. C., Podowski R. M., Näslund A. K., Eriksson A. S., Winkler H. H., Kurland C. G. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature. 396 : 133—140.
- Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S. A., Radek A. J., Shevchenko D. V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J. W., Hogenhout S. A. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. J. Bacteriol. 188 : 3682—3696.
- Borchsenius S. N., Budantseva E. V., Vonsky M. S. 1990. The heat-shock proteins of *Acholeplasma laidlawii*. Stanek G., Cassell G. H., Tully J. G., Whitcomb R. F. (Eds.). Recent advances in mycoplasmology. In: Zentralblatt für Bakteriologie. Stuttgart; New York: Gustav Fisher Verlag. Suppl. 20 : 657—658.

- Caspers G. J., Leunissen J. A. M., de Jong W. W. 1995. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved α -crystallin domain. *J. Mol. Evol.* 40 : 238—248.
- Chanoch R. M., Hayflick L., Barile M. F. 1961. Grow on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 48 : 41—49.
- Dascher C. C., Poddar S. K., Maniloff J. 1990. Heat shock in mycoplasmas, genome-limited organisms. *J. Bacteriol.* 172 : 1823—1827.
- De Jong W. W., Caspers G. J., Leunissen J. A. M. 1998. Genealogy of the α -crystallin-small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.* 22 : 151—162.
- Fraser C. M., Gocayne J. D., White O., Adams M. D., Clayton R. A., Fleischmann R. D., Bult C. J., Kerlavage A. R., Sutton G., Kelley J. M., Fritchman R. D., Weidman J. F., Small K. V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T. R., Saudek D. M., Phillips C. A., Merrick J. M., Tomb J. F., Dougherty B. A., Bott K. F., Hu P. C., Lucier T. S., Peterson S. N., Smith H. O., Hutchison C. A., 3rd, Venter J. C. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science.* 270 : 397—403.
- Horváth I., Glatz A., Varvasovszki V., Török Z., Páli T., Balogh G., Kovácz E., Nádasdi L., Benkő S., Loó F., Vigh L. 1998. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a «fluidity gene». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 : 3513—3518.
- Jakob U., Gaestel M., Engel K., Buchner J. 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 268 : 1517—1520.
- Kuske C. R., Kirkpatrick B. C. 1992. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42 : 226—233.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature. (London)* 227 : 680—685.
- Lindquist S. 1966. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 1151—1191.
- Lo S.-C., Hayes M. M., Wang R. Y.-H., Pierce P. F., Kotani H., Shin J. W. 1991. Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. *Lancet.* 338 : 1415—1418.
- Narberhaus F. 2002. α -Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 : 64—93.
- Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H. Y., Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S., Ugaki M., Namba S. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat. Genet.* 36 : 27—29.
- Reznik R. A. 1957. Lens proteins. I. Alpha crystallin of calf lens. *Amer. J. Ophthalmol.* 44 (5, Pt 2) : 357—362.
- Richmond C. S., Glasner J. D., Mau R., Jin H., Blattner F. R. 1999. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucl. Acids Res.* 27 : 3821—3835.
- Rodwell A. W. 1983. Defined and partly defined media. In: *Methods in mycoplasmology.* 163—172.
- Sasaki Y., Ishikawa J., Yamashita A., Oshima K., Kenri T., Furuya K., Yoshino C., Horino A., Shiba T., Sasaki T., Hattori M. 2002. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucl. Acids Res.* 30 : 5293—5300.
- Shigenobu S., Watanabe H., Hattori M., Sakaki Y., Ishikawa H. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature.* 407 : 81—86.
- Stephens R. S., Kalman S., Lammel C., Fan J., Marathe R., Aravind L., Mitchell W., Olinger L., Tatusov R. L., Zhao Q., Konon E. V., David R. W. 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science.* 282 : 754—759.
- Tsvetkova N. M., Horváth I., Török Z., Wolkers W. F., Balogi Z., Shigapova N., Crowe L. M., Tablin F., Vierling E., Crowe J. H., Vigh L. 2002. Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 13 504—13 509.
- Westberg J., Persson A., Holmberg A., Goesmann A., Lundberg J., Johansson K. E., Pettersson B., Uhlén M. 2004. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res.* 14 : 221—227.
- Wong P., Houry W. A. 2004. Chaperone networks in bacteria: analysis of protein homeostasis in minimal cells. *J. Struct. Biol.* 146 : 79—89.

Поступила 15 I 2008

THE HEAT SHOCK PROTEIN OF α -CRYSTALLIN TYPE FROM MYCOPLASMA (*ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*)

S. N. Borchsenius,^{1,*} I. E. Vishnyakov,¹ E. V. Budantseva,¹ M. S. Vonskij,¹ E. Jacobs,² V. N. Lazarev³

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, ² Institute für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, D-01307 Dresden, Germany, and ³ Science Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Federal Agency for Public Health and Social Development, Moscow; * e-mail: borch@cytspb.ru

A considerable increase in several heat shock proteins (HSPs) amount in *Acholeplasma laidlawii* cells has been revealed after temperature rising of liquid culture; and the quantity of small HSP, named p17, was increased in a hundred of times. The p17 protein was isolated and identified as HSP of α -crystallin type (α -HSP). It became possible as a result of sequencing of 15 amino acids from N-terminal of the p17 polypeptide chain, followed by revealing of a corresponding open reading frame (ORF) in a completely sequenced genome of *A. laidlawii* PG 8A. Computer-based search for homologous ORFs in all 17 genomes of *Mycoplasmataceae* family (the mycoplasmas themselves) that had been completely sequenced to date, gives negative result. But among the representatives of Mollicutes (mycoplasma) class, the genes coding α -HSPs were found in two *Phytoplasmataceae* species (*Phytoplasmataceae* family) and the acholeplasma examined (*Acholeplasmataceae* family). It supposed that presence or absence of α -HSPs in microorganisms might be connected with the fact that representatives of *Acholeplasmataceae* and *Phytoplasmataceae* families inhabit principally in plant tissues in contrast to majority of *Mycoplasmataceae* family, that inhabit animal and human tissues, i. e. use ecological niches with relatively constant temperature.

Key words: mycoplasmas, heat shock proteins, α -HSP, bioinformatics.