

## ВЛИЯНИЕ ТЕПЛОВОГО ШОКА НА КЛЕТКИ ФИТОПАТОГЕННОЙ МИКОПЛАЗМЫ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII PG-8A*

© И. Е. Вишняков,<sup>1,\*</sup> С. А. Левицкий,<sup>2</sup> С. Н. Борхсениус<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,  
<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва  
\*электронный адрес: innvish@gmail.com

Действие теплового шока на культуру микоплазмы *Acholeplasma laidlawii PG-8A* вызывало более активное, чем обычно, образование клетками «спящих» форм (мини-тел), а также увеличение продукции экстраклеточных мембранных везикул. При стрессе рост количества мини-тел, характеризующихся повышенной устойчивостью к биогенным и абиогенным стрессовым факторам и патогенностью, может приводить к более успешной персистенции микоплазм, а увеличение продукции клетками *A. laidlawii* экстраклеточных мембранных везикул, содержащих факторы вирулентности, — к дополнительной нагрузке на инфицированный организм. Недавно было выявлено, что везикулы *A. laidlawii* содержат в заметных количествах малый белок теплового шока IbpA (Hsp20). В данной работе методами иммуноэлектронной микроскопии мы показали, что при повышенной температуре IbpA ассоциирован и с мини-телями *A. laidlawii*. Возможно, IbpA вносит вклад в повышенную устойчивость и патогенность мини-тел при стрессе, сохраняя белки и полипептиды, входящие в их состав, в том числе белковые факторы вирулентности, в фолдинг-компетентном состоянии.

**Ключевые слова:** микоплазмы, тепловой шок, мини-тела, экстраклеточные мембранные везикулы, стрессоустойчивость, вирулентность, малый белок теплового шока.

Вездесущую микоплазму *Acholeplasma laidlawii* выделяют из почвы, компоста и сточных вод, а также из тканей людей, животных и растений (Razin et al., 1998). Доказано, что *A. laidlawii* вызывает фитоплазмы, сопровождающиеся некрозом клеток мезофилла, апоптозом клеток флоэмы, деструкцией хлорофилла и нарушением ультраструктуры клеточных органелл, нанося вред сельскохозяйственным культурам растений (Чернов и др., 1999; Chernov et al., 2011a). При неблагоприятных условиях среди *A. laidlawii* способна образовывать «спящие» формы (мини-тела), отличающиеся от обычных клеток меньшим размером, повышенной устойчивостью к биогенным и абиогенным стрессовым факторам и фитопатогенностью (Чернов и др., 2005; Chernov et al., 2007). Кроме того, *A. laidlawii* входит в первую пятерку наиболее часто встречающихся контаминаントов клеточных культур (Windsor et al., 2010). Клетки этой микоплазмы способны расти до высоких титров в культурах клеток высших эукариот и на питательных средах. Жизнеспособные клетки *A. laidlawii* были обнаружены даже в компонентах питательных сред, хранящихся в виде сухого порошка.

На сегодняшний день нет достоверных сведений о способности *A. laidlawii* вызывать заболевания у человека. Однако недавно было показано, что клетки *A. laidlawii* производят в окружающую среду экстраклеточные мембранные везикулы, которые содержат большое количество факторов вирулентности (Музыкантов и др., 2014). При обработке лимфоцитов периферической крови человека фракцией мембранных везикул *in vitro* у 95 %

клеток в клеточной культуре возникают хромосомные aberrации (Chernov et al., 2011b). Кроме того, почти полвека назад было сообщение о выделении *A. laidlawii* из костного мозга людей, больных лейкемией (Hayflick, Stanbridge, 1967). Другие авторы (Rakovskaya et al., 1982) инфицировали мышей одновременно вирусом лейкоза Раушера и клетками *A. laidlawii*, что вызывало особенно сильную иммуносупрессию, гораздо более заметную, чем при заражении животных только вирусным агентом, а также состояние прелейкоза. Вирус лейкоза Раушера и клетки *A. laidlawii* оказывали митогенный эффект и вызывали инфильтрацию селезенки незрелыми лейкемическими клетками. Вполне вероятно, *A. laidlawii* может угнетать иммунную систему человека и каким-то образом способствовать возникновению раковых клеток крови.

Увеличение продукции экстраклеточных мембранных везикул клетками *A. laidlawii*, как и повышенное образование мини-тел, наблюдали в условиях голодаания или при длительном культивировании в обедненной питательной среде, из которой исключали глюкозу и дрожжевой экстракт (Чернов и др., 2005; Chernov et al., 2011a). *In vivo* на клетки *A. laidlawii* при их персистенции в организме человека, приматов (Neto et al., 2013) или сельскохозяйственных животных (Jordan, Amin, 1980) должны влиять и колебания температуры тела организма-хозяина, например ее повышение в период острых инфекционных заболеваний. Это может приводить к изменениям в стратегии выживания микоплазм, способствовать образованию устойчивых к стрессу форм (мини-тел) и увеличе-

нию продукции экстраклеточных мембранных везикул, содержащих факторы вирулентности. Микоплазмы, инфицирующие растения, в еще большей степени подвергаются воздействию температурных колебаний окружающей среды. В связи с этим мы посчитали важным исследовать влияние теплового шока на клетки *A. laidlawii*.

В работе выполнен сравнительный анализ размеров, формы и ультраструктуры клеток микоплазм, выращенных при оптимальной температуре культивирования, и клеток, подвергнутых стрессовому воздействию. Эксперименты с использованием методов иммуноэлектронной микроскопии позволили выявить ассоциацию малого белка теплового шока (мБТШ) IbpA (Hsp20) с мини-телами *A. laidlawii*. Обсуждается возможный вклад IbpA в повышенную патогенность мини-тел *A. laidlawii* и их способность к персистенции.

## Материал и методика

**Бактериальные штаммы и условия культивирования.** В работе использовали штамм *Acholeplasma laidlawii* PG-8A (Коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Микоплазмы культивировали на модифицированной жидкой среде Хейфлика (НИЦФ, Санкт-Петербург), содержащей 0.2 % глюкозы (Freundt, 1983), в стерильных эпендорфах, без качания. Для индикации pH в среду вносили стерильный водный раствор фенолового красного до малиновой окраски. Рост микоплазм определяли по появлению сначала красного, а потом желтого цвета. Перед тепловым шоком культуру *A. laidlawii* PG-8A, находящуюся в стадии замедления роста (24 ч культивирования), делили на две равные части. Одну часть продолжали культивировать при оптимальной температуре (30 °C), другую часть подвергали воздействию теплового шока, который инициировали повышением температуры с 30 до 42 °C на 90 мин. Затем температуру понижали до 37 °C и продолжали культивирование микоплазм еще в течение 90 мин. В предыдущих работах похожие условия способыствовали максимальному накоплению в клетках микоплазм малого белка теплового шока IbpA (Борхсениус и др., 2008; Вишняков и др., 2010; Vishnyakov et al., 2012).

**Электронная микроскопия.** Для исследования ультраструктуры клетки *A. laidlawii*, как подвергнутые, так и не подвергнутые воздействию теплового шока, фиксировали добавлением в жидкую среду 25%-ного раствора глутаральдегида (Ted Pella, США) до конечной концентрации 2.5 %. Через 30 мин клетки собирали центрифугированием (10 000 об/мин, 10 мин). Надосадок сливали, осадок обрабатывали 1%-ным раствором OsO<sub>4</sub> (30 мин), обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (70, 96 % и абсолютный спирт) и ацетоне, пропитывали и заливали в смесь Эпон—Аралдит (Миронов и др., 1994). Полимеризацию смолы проводили при 60 °C в течение 2 сут. Ультратонкие срезы готовили на микротоме Ultratome III 8800 (LKB, Швеция), контрастировали спиртовым раствором уранил-ацетата и раствором цитрата свинца и просматривали в электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). В каждом варианте эксперимента (норма и тепловой шок) анализировали по 10 полей зрения (при увеличении 13 000×). В отдельно взятом поле зрения при этом наблюдали от 51 до 133 клеток.

С целью проведения иммуноэлектронной микроскопии клетки *A. laidlawii*, подвергнутые воздействию теп-

лового шока, фиксировали добавлением в жидкую среду 37%-ного раствора формальдегида и 25%-ного раствора глутаральдегида (Ted Pella, США) до конечных концентраций 2 и 0.1—0.2 % соответственно. Супензию клеток выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего зафиксированные клетки собирали центрифугированием (10 000 об/мин, 10 мин). Осадки дегидратировали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (70 и 96 %) и заливали в смолу LR-White (Polyscience, INC, США). Смолу полимеризовали при 54 °C в течение 2 сут. Иммуноцитохимические эксперименты проводили на ультратонких срезах клеток в соответствии со стандартным протоколом (Миронов и др., 1994). Анти-тела против IbpA, полученные нами ранее (Вишняков и др., 2010), разводили (1 : 50) в PBS, содержащем 0.1 % BSA. Раствор белка A, конъюгированного с частицами коллоидного золота диаметром 15 нм (EY Laboratories, INC, США), использовали в качестве вторых антител (1 : 50). Срезы окрашивали спиртовым раствором уранил-ацетата и раствором цитрата свинца и просматривали в электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). В контроле либо не использовали специфических антител, либо вместо них использовали кроличью неиммунную сыворотку.

## Результаты

**Размер, форма и ультраструктура клеток *A. laidlawii* в норме и при тепловом шоке.** Объекты, встречающиеся в поле зрения электронного микроскопа на ультратонких срезах микоплазм, зафиксированных в 2.5%-ном глутаральдегиде и 1%-ном OsO<sub>4</sub> и заливших в смесь Эпон—Аралдит, можно отнести к трем основным типам: обычные клетки, мини-тела и экстраклеточные мембранные везикулы (рис. 1).

Обычные клетки (рис. 1, a) имеют размер от 200 нм до 1 мкм в диаметре, в основном они округлые или овальные, редко — вытянутые или неправильной формы. Длинные филаменты и цепочки из коккоидных форм, характерные для штамма *A. laidlawii* B (Maniloff, 1970), встречаются крайне редко. Клетки делятся бинарно, часто с образованием асимметричных дочерних клеток. Делящиеся клетки имеют характерную гантелеобразную форму. Все клетки ограничены цитоплазматической мембраной (бислоем) толщиной 6—9 нм. В цитоплазме хорошо различимы электронно-плотные и электронно-прозрачные области. В электронно-плотных областях присутствуют крупные темные зерна 10—15 нм в диаметре (рибосомы), иногда собранные в цепочки (по-видимому, полирибосомы). Встречаются также мелкозернистые участки, названные ранее «гранулярными тельцами» (Maniloff, 1970). Электронно-плотный материал внутри этих участков однороден, они не содержат каких-либо крупных гранул или фибрилл. В ряде случаев создается впечатление, что эти области ограничены мембраной от остального содержимого клетки. Достаточно часто можно наблюдать по несколько «гранулярных телец» в одной клетке. Однако не стоит исключать возможности прохождения плоскости среза таким образом, что захватывается сразу несколько участков одного «тельца». В электронно-прозрачных областях хорошо заметны толстые и тонкие нити, образующие разветвленную сеть. Этот фибриллярный материал, по-видимому, представляет собой тяжи нуклеоида. Иногда материал нуклеоида сильно сконден-

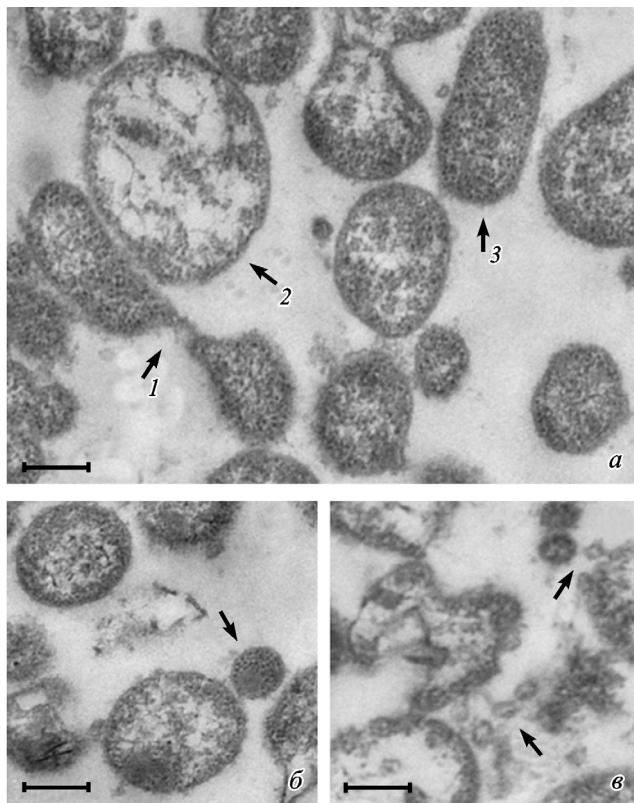


Рис. 1. Ультраструктура *Acholeplasma laidlawii* PG-8А.

Основные типы объектов, встречающиеся на ультратонких срезах микоплазм: обычные клетки (а), мини-тела (б, стрелка) и экстраклеточные мембранные везикулы (в, стрелки). а: 1 — клетка в процессе деления, 2 — наличие в цитоплазме большого количества электронно-прозрачных областей, 3 — электронно-плотное содержимое цитоплазмы. Крупные темные гранулы в цитоплазме клеток — рибосомы; фибрillлярный материал, преимущественно располагающийся в электронно-прозрачных участках цитоплазмы, — тяжи нуклеоида. На срезе мини-тела (б) хорошо заметна гранулярная область, которая смещена к периферии клетки; остальное пространство цитоплазмы плотно заполнено рибосомами. Масштабные отрезки — 200 нм.

сирован, и видны один или два толстых тяжа, расположенные ближе к центру клетки. В некоторых клетках можно наблюдать участки в цитоплазме, ограниченные двухслойной мембраной, электронно-прозрачные или заполненные гомогенным слабо электронно-плотным содержимым. При этом они похожи на внутриклеточные мембранные везикулы. Однако, особенно в случае электронно-прозрачного содержимого этих областей, мы не исключаем и вероятности прохождения плоскости среза через клетку неправильной формы таким образом, что захватывается часть внеклеточного пространства между выростами клетки. При этом клетки неправильной формы, разветвленные, с множественными выростами в фазе замедления роста культуры *A. laidlawii* PG-8А встречаются редко. Помимо вышеуказанных структур в клетках микоплазм в ряде случаев можно наблюдать упорядоченные структуры, напоминающие элементы цитоскелета (Vishnyakov et al., 2012).

Мини-тела (рис. 1, б) — маленькие клетки округлой формы, диаметром около 200 нм или немногим меньше. Содержимое клеток ограничено двухслойной мембраной, цитоплазма «набита» рибосомами. Присутствуют одно или несколько «гранулярных телец» (мелкозернистых об-

ластей) на одно мини-тело, они смещены к периферии клетки. Нет электронно-прозрачных областей. Тяжи нуклеоида или совсем не просматриваются, или плохо заметны, вероятно из-за весьма электронно-плотного содержащего мини-тел. Создается впечатление, что клеточный материал мини-тел сконцентрирован в минимальном объеме и представляется упорядоченным.

Экстраклеточные мембранные везикулы (рис. 1, в) — объекты, ограниченные мембраной, сферические, замкнутые, на срезах диаметр варьирует от 20 до 130 нм. Обычно они наполнены электронно-прозрачным или слабо электронно-плотным гомогенным материалом, однако иногда в их составе встречаются и мелкие темные гранулы. Одним из важных критериев определения объектов по их срезам как экстраклеточных мембранных везикул является отсутствие на поверхности какого-либо внешнего материала (мембранных завитков, обломков клеток) (Lee et al., 2009). Кроме того, ранее при исследовании ультраструктуры экстраклеточных мембранных везикул в них не было замечено крупных темных гранул — рибосом (Chernov et al., 2011b, 2012), а методом ПЦР было установлено, что везикулы не содержат генов, кодирующих субъединицы рибосом (Chernov et al., 2012). Везикулы наблюдали как на поверхности клеток микоплазм, так и в межклеточном пространстве.

Все указанные типы объектов встречали как в культуре *A. laidlawii* PG-8А, выращенной при оптимальной температуре (30 °C), так и в культуре, подвергнутой воздействию теплового шока (42 °C). Кроме вышеописанных объектов на срезах в некотором количестве присутствовал клеточный мусор — обломки клеток, погибших в процессе культивирования, при воздействии теплового шока либо разрушенных во время сбора и фиксации материала (обрывки мембран, острочки электронно-плотного содержимого цитоплазмы, тяжи нуклеоида). Клеточный мусор с трудом поддается классификации и учету. Визуально больше мусора наблюдали в культуре, подвергнутой воздействию теплового шока.

При сравнительном анализе (табл. 1, 2) особое внимание уделяли: 1) распределению клеток *A. laidlawii* по размерам в зависимости от условий культивирования; 2) взаимному расположению электронно-плотных и электронно-прозрачных участков в цитоплазме клеток микоплазм; 3) наличию «гранулярных телец»; 4) доле клеток с отчетливо видимыми повреждениями (лизисом внутреннего содержимого цитоплазмы, разрывом мембраны, выпадением из клетки части клеточного материала) и внутренними мембранами, возможно клеток нежизнеспособных (по: Maniloff, 1970) или клеток с внутриклеточными мембранными везикулами; 5) доле делящихся клеток в культуре; 6) количеству мини-тел и экстраклеточных мембранных везикул.

При оптимальных условиях культивирования (30 °C) в стадии замедления роста культуры *A. laidlawii* PG-8А более 80 % клеток имело размер от 200 до 800 нм в диаметре, при этом преобладали клетки диаметром 400—600 нм (табл. 1). Клетки меньшего размера (<200 нм) составляли около 16 % от общего числа клеток в культуре, менее 1 % всех клеток имело размер 800 нм в диаметре и больше. В культуре, подвергнутой воздействию теплового шока (42 °C), значительно увеличилось количество как очень маленьких, так и очень крупных клеток (табл. 1): с диаметром <200 нм — почти в 2 раза, с диаметром от 800 нм до 1 мкм — в 1.6, с диаметром >1 мкм — в 4 раза. Количество клеток малого диаметра, по-видимому, воз-

Таблица 1

Влияние теплового шока на размер клеток *Acholeplasma laidlawii*

Условия культивирования	Доля клеток (%), имеющих размер, нм					
	<200	200—400	400—600	600—800	800—1000	>1000
Оптимальные (контроль)	16.5	30.2	42.5	10.0	0.7	0.1
Тепловой шок	30.4	26.0	34.5	7.6	1.1	0.4
Величина изменения (разы)	1.84	0.86	0.81	0.76	1.57	4.0

Примечание. Подсчет клеток производили в 10 полях зрения при увеличении 13 000×. Представлены усредненные результаты.

росло за счет более интенсивного, чем обычно, формирования мини-тел. У очень крупных клеток (>800 нм) электронно-плотное содержимое было смешено к периферии, некоторые из них выглядели обводненными, у части клеток была нарушена целостность оболочки. Разбухшие клетки огромного по сравнению с нормальными клетками размера (1 мкм в диаметре и более) относят к аберрантным формам (Maniloff, 1970), возникающим на поздних стадиях роста культуры. Вероятно, эти клетки являются нежизнеспособными.

Самыми заметными следствиями воздействия кратковременного теплового шока на *A. laidlawii* PG-8A (табл. 2) были следующие: 1) значительное увеличение (приблизительно в 2 раза) количества мини-тел в культуре; 2) многократный (в 6.4 раза) рост числа клеток, содержащих «гранулярные тельца»; 3) смещение электронно-плотного содержимого цитоплазмы к периферии и образование обширных электронно-прозрачных участков более чем у 50 % клеток микоплазм (без учета мини-тел, ультраструктура которых оставалась неизменной). Кроме того, почти

в 3 раза (до 10 % от общего числа) увеличилось количество клеток с отчетливо видимыми повреждениями. У многих клеток наблюдали лизис внутреннего содержимого цитоплазмы, часто встречали обводненные (раздувшиеся) клетки с разрывом внешней мембранны, при этом в ряде случаев через разрыв выпадала часть клеточного материала (электронно-плотный материал цитоплазмы, тяжи нуклеоида). В культуре, подвергнутой воздействию теплового шока, уменьшилось и без того небольшое количество делящихся клеток (в 2 раза) и клеток, содержащих внутренние мембранны (в 1.8 раза). При этом возросло количество экстраклеточных мембранных везикул (в 1.4 раза).

С помощью атомно-силовой микроскопии ранее было показано, что клетки *A. laidlawii*, диаметр которых не превышает 300 нм, не продуцируют везикулы (Chernov et al., 2011b). К таким клеткам, несомненно, можно отнести все мини-тела. Без учета мини-тел становится еще более очевидным факт увеличения при тепловом шоке продукции клетками микоплазм экстраклеточных мембранных везикул (в 1.6 раза). Кроме того, в культуре, подвергну-

Таблица 2

Влияние теплового шока на целостность клеток *Acholeplasma laidlawii* PG-8A, их ультраструктуру, а также на продукцию клетками экстраклеточных мембранных везикул

Клетки	Доля (%) от общего числа клеток		
	при оптимальных условиях	при тепловом шоке	изменение (разы)
С внутренними мембранами	5.6	3.1	0.55
С повреждениями	3.4	9.8	2.9
Электронно-плотное содержимое смешено к периферии	13.7	39.3	2.9
То же без учета мини-тел (не имеют электронно-прозрачных областей)	15.7	52.6	3.35
С «гранулярными тельцами»	4.3	27.4	6.4
Делящиеся (гантелеобразной формы)	3.8	1.9	0.5
Мини-тела	13.0	25.3	1.95
Везикулы	Среднее число везикул на 1 клетку		
	при оптимальных условиях	при тепловом шоке	изменение (разы)
С учетом всех клеток	0.5	0.7	1.4
Без учета мини-тел (не продуцируют везикулы)	0.6	0.95	1.6

Примечание. Подсчет клеток и экстраклеточных мембранных везикул производили в 10 полях зрения при увеличении 13 000×. Представлены усредненные результаты.

той воздействию теплового шока, незначительно возросло общее количество клеток (в 1.1 раза). Это может быть следствием увеличения количества мини-тел, так как доля обычных клеток, находящихся в процессе цитокинеза, в исходной культуре слишком мала (около 4 %) и их становится еще меньше при воздействии повышенной температуры (количество сокращается до 2 %).

**Ассоциация мБТШ с мини-телами *A. laidlawii*.** При тепловом шоке клетки как прокариот, так и эукариот приостанавливают синтез большинства белков и увеличивают скорость синтеза белков, называемых белками теплового шока (БТШ). Среди БТШ обильно представлены шапероны, ко-шапероны и протеазы. Шапероны совместно с кошаперонами участвуют в рефолдинге частично денатурированных полипептидов, тогда как протеазы расщепляют белки, подвергшиеся необратимой денатурации (Parsell, Lindquist, 1993). мБТШ являются шаперон-подобными белками с мол. массами от 10 до 43 кДа (Narberhaus, 2002), они предотвращают необратимую денатурацию и агрегацию белков и полипептидов в условиях стресса (при тепловом шоке, окислительном стрессе, химической денатурации) и способны длительное время сохранять их в фолдинг-компетентном состоянии (*in vitro* — в течение недель). Среди микроорганизмов, способных к самостоятельному воспроизведению, микоплазмы обладают наименьшим набором генов, кодирующих шапероны и протеазы; регуляция их экспрессии также, по-видимому, упрощена (Вишняков, Борхсениус, 2013). При этом мБТШ и их гены были обнаружены только у представителей семейства *Acholeplasmataceae*. К настоящему времени охарактеризован лишь один микоплазменный мБТШ — IbpA *A. laidlawii* (Борхсениус и др., 2008; Вишняков и др., 2010). Показано, что при тепловом шоке 65 % белка IbpA, ассоциированного с различными структурами клетки, локализовано в электронно-плотных областях, называемых «гранулярными тельцами», 20 % — по мембране, 10 % — вдоль упорядоченных структур, напоминающих элементы цитоскелета, и 5 % — в области перетяжки между делящимися клетками микоплазм (Vishnyakov et al., 2012). Кроме того, недавно было выявлено, что IbpA в заметных количествах содержится в экстраклеточных мембранных везикулах *A. laidlawii* (Chernov et al., 2014).

Мы заметили, что при тепловом шоке наиболее электронно-плотные участки цитоплазмы клеток *A. laidlawii* PG-8A со скоплениями рибосом и «гранулярных телец» расположены в местах формирования мини-тел (рис. 2). Возможно, в таких участках цитоплазмы происходит активный синтез белков. «Гранулярные тельца» при этом, как и предполагалось ранее (Maniloff, 1970), могут играть роль «кладовых» клетки, в которых накапливаются питательные вещества и ферменты. Эти «кладовые» впоследствии оказываются в составе мини-тел. Автором цитируемой выше работы было также показано, что в клетках штамма *A. laidlawii* В «гранулярные тельца» не отделены от остального содержимого цитоплазмы. В клетках *A. laidlawii* PG-8A в ряде случаев нами отмечено наличие структуры, напоминающей мембрану, ограничивающую эти области внутри микоплазменной клетки. «Гранулярные тельца» при этом напоминали пузырьки с мелкозернистым электронно-плотным содержимым и не различались по структуре в обычных клетках и в составе мини-тел.

По электронным микрофотографиям мы попытались реконструировать процесс формирования мини-тел *A. la-*

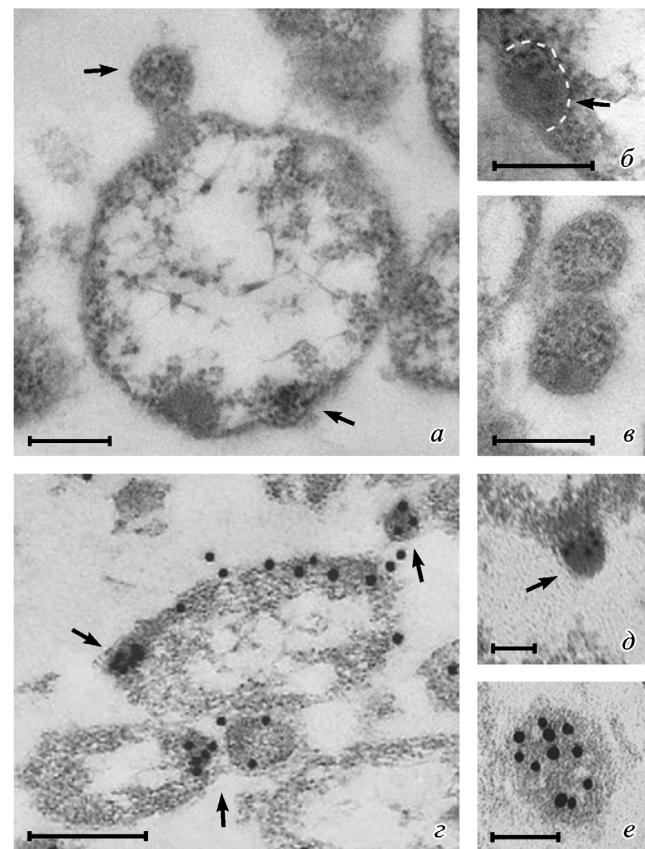


Рис. 2. Образование мини-тел (стрелки) *Acholeplasma laidlawii* PG-8A. Ассоциация IbpA с мини-телами в условиях теплового шока (42 °C).

*a* — в нижней части изображения крупной микоплазменной клетки обозначена электронно-плотная область, где начинается формирование мини-тела, в верхней — мини-тело находится в процессе отделения от материнской клетки; *b* — формирующееся мини-тело (границы выделены штриховой линией): выпячивание внешней цитоплазматической мембраны во внеклеточное пространство, ограниченная мембраной электронно-плотная область внутри клетки, в которой видны рибосомы и несколько «гранулярных телец», рядом наблюдается скопление рибосом и электронно-плотного материала цитоплазмы; *c* — отделившееся мини-тело; *d* — локализация IbpA: электронно-плотные частицы коллоидного золота, конъюгируемые со стафилококковым белком A, способным узнавать иммуноглобулины G кролика (поликлональные кроличьи антитела против IbpA), ассоциированы как с формирующимиися (*c*, *d*), так и с отдельно лежащими (*c*, *e*) мини-телами. Масштабные отрезки — 200 (*a*—*c*) и 100 (*d*, *e*) нм.

*idlawii* PG-8A. Вероятно, на начальном этапе происходит концентрация электронно-плотного материала цитоплазмы (скопление рибосом, образование «гранулярных телец») на периферии клетки (рис. 2, *a*, нижняя часть клетки). Часть рибосом и одно или несколько гранулярных телец упаковываются в мембранные пузырьки — будущие мини-тела (рис. 2, *b*). Затем происходит выпячивание цитоплазматической мембранны клетки во внеклеточное пространство. Ограниченная мембраной электронно-плотная область внутри клетки, в которой видны рибосомы и «гранулярные тельца», выталкивается наружу, и через некоторое время мини-тело отшнуровывается от материнской клетки (рис. 2, *a*, вверху клетки). Процесс напоминает асимметричное деление или почкование.

Когда ультратонкие срезы микоплазм, заливших в смолу LR-White, обрабатывали поликлональными антителами против мБТШ IbpA *A. laidlawii* PG-8A и белком A,

конъюгированным с частицами коллоидного золота диаметром 15 нм, часто наблюдали локализацию специфической метки в области как формирующихся (рис. 2, *г*, *д*), так и отделившихся мини-тел (рис. 2, *г*, *е*). Таким образом, IbpA *A. laidlawii* PG-8A ассоциирован с мини-телами микоплазмы и может участвовать как в процессе их формирования, так и в защите их содержимого (термолабильных ферментов, факторов вирулентности) от воздействия неблагоприятных условий окружающей среды, в том числе колебаний температуры.

## Обсуждение

Данные по ультраструктуре клеток *A. laidlawii* B, собранных на разных стадиях роста культуры, были получены почти полвека назад (Maniloff, 1970). Позже на другом штамме — *A. laidlawii* PG-8A — были описаны «спящие» формы (мини-тела) ахолеплазмы, обладающие повышенной устойчивостью к биогенным и абиогенным стрессовым факторам и фитопатогенностью (Чернов и др., 2005, 2007; Chernov et al., 2007). Были описаны и экстраклеточные мембранные везикулы, в состав которых входит большое количество разных белков, в том числе факторы вирулентности (Музыкантов и др., 2014). В цитируемых работах разных лет как мини-тела, так и экстраклеточные мембранные везикулы обозначены общим термином «ультрамикроформы».

Согласно данным литературы, размер экстраклеточных мембранных везикул различных бактерий может варьировать от 20 до 250 нм в диаметре (McBroom, Kuehn, 2007). В этом случае все «ультрамикроформы» микоплазм можно было бы принять за везикулы. Однако мини-тела *A. laidlawii* PG-8A способны делиться (Чернов и др., 2005), образовывать неклассические колонии на твердой агаризованной среде, напоминающие колонии, которые образуют микоплазмы, выделенные из почвы (Серебренникова, 2005), выживать длительное время (120 сут и более) на «голодной» среде и реверсировать в обычные клетки при перенесении в свежую богатую питательную среду (Чернов и др., 2005, 2007). Таким образом, мини-тела *A. laidlawii* являются клетками, но отличаются по размерам, ультраструктуре и свойствам от обычных клеток микоплазм. Везикулы же могут участвовать в горизонтальном переносе генов, способствуя развитию устойчивости микоплазм к антибиотикам (Medvedeva et al., 2014). Кроме того, они характеризуются вирулентностью, так как обладают рядом свойств — инфекционностью, инвазивностью и токсигенностью по отношению к организму-хозяину: попадая в ткани растений, везикулы вызывают множественные нарушения ультраструктуры клеточных органелл, как и при полноценном заражении микоплазмами (Chernov et al., 2012). Таким образом, в культуре *A. laidlawii* встречаются разные типы объектов — обычные клетки, мини-тела и экстраклеточные мембранные везикулы.

Мы уделили особое внимание характеристике объектов, встречающихся на ультратонких срезах микоплазм, поскольку может возникать путаница в идентификации мини-тел и экстраклеточных мембранных везикул по их срезам, которые в ряде случаев в зависимости от прохождения плоскости среза обладают сходными размерами: 200 нм и меньше — у мини-тел и от 20 до 130 нм — у везикул. Ранее с помощью атомно-силовой микроскопии были идентифицированы две фракции «ультрамикро-

форм» *A. laidlawii*, отличающиеся друг от друга по размеру: 70—90 и 110—120 нм в диаметре (Chernov et al., 2011b). Было бы логично предположить, что первая фракция — это именно везикулы, а вторая — мини-тела. Однако диаметр мини-тел на срезах часто достигает 180—200 нм, а везикул — около 20. Слишком маленький диаметр некоторых везикул можно объяснить плоскостью прохождения среза по краю этих «пузырьков». Мини-тела же, диаметр которых на срезах достигает 200 нм, не могут входить в состав фракции 110—120 нм. Скорее всего, фракция 70—90 нм представляет собой исключительно везикулы, тогда как во фракции 110—120 нм встречаются как везикулы, так и мини-тела и с помощью атомно-силовой микроскопии отделить их друг от друга не представляется возможным.

На ультратонких срезах главным критерием отличия мини-тел от экстраклеточных мембранных везикул мы считаем наличие в цитоплазме мини-тел крупных электронно-плотных гранул (10—15 нм в диаметре), идентифицированных ранее как рибосомы (Maniloff, 1970). Фракция рибосом была выделена в свое время из клеток *Mycoplasma gallisepticum* и проанализирована химически (Maniloff et al., 1965). Мы не исключаем возможности попадания рибосом в некоторые везикулы. Однако при описании ультраструктуры экстраклеточных мембранных везикул авторы ни разу не упомянули о наличии в их составе характерных гранул (Chernov et al., 2011a, 2011b, 2012), но убедительно показали, что везикулы не содержат генов, кодирующих субъединицы рибосом (Chernov et al., 2012).

При тепловом шоке количество как мини-тел, так и экстраклеточных мембранных везикул возрастает. Увеличение продукции везикул бактериальными клетками при повышенной температуре наблюдали и ранее (McBroom, Kuehn, 2007). Клеток, диаметр которых не превышает 200 нм на срезе, в культуре *A. laidlawii*, подвергнутой влиянию стресса, становится значительно больше. Они представляют собой в основном именно мини-тела. Увеличения количества сильно вытянутых или ветвящихся форм, которые могли бы иметь диаметр в поперечном сечении, сопоставимый с размерами мини-тел, при тепловом шоке не происходит. Количество же делящихся клеток, когда плоскость среза может пройти по перетяжке, при тепловом шоке уменьшается. Кроме того, мини-тела имеют характерную, хорошо узнаваемую ультраструктуру: их электронно-плотная цитоплазма буквально «набита» рибосомами и содержит одно или несколько «гранулярных телец». Нуклеоид мини-тел находится в конденсированном состоянии (Trushin et al., 2010), остальное содержимое также выглядит упорядоченным, словно материал клеток аккуратно «упакован» в минимально необходимом объеме. Мини-тела *A. laidlawii* напоминают элементарные тела хламидий (Eb et al., 1976; Vromman et al., 2014), которые характеризуются меньшим, чем ретикулярные тела, размером, электронно-плотным содержимым цитоплазмы и повышенной патогенностью.

Известно, что количество мини-тел в культуре *A. laidlawii* увеличивается при голодании (Чернов и др., 2005). Микоплазмы активно образуют мини-тела в тканях растений, генерирующих при заражении неспецифический ответ, при котором создаются условия хронического окислительного стресса (Чернов и др., 1999). В предварительно адаптированной к стрессам культуре микоплазм (рост в обедненной среде), в которой увеличена субпопуляция мини-тел, при обработке пероксидом водорода, после

кратковременного, но сильного теплового шока ( $48^{\circ}\text{C}$ , 60 мин), а также при длительном культивировании в условиях мягкого теплового шока количество колониесобразующих единиц было выше, чем в неадаптированной культуре *A. laidlawii* (Чернов и др., 2005). Вероятно, стресс вызывает гибель обычных клеток микоплазм, а колонии формируют выжившие мини-тела.

Считают, что клетки *A. laidlawii* образуют мини-тела в результате асимметричного клеточного деления, которому предшествует конденсация нуклеоида (Чернов и др., 2005). Образование мини-тел клетками микоплазм показано на рис. 2, где видно, что одна клетка может сформировать сразу несколько мини-тел (рис. 2, *a, г*). При этом смещение электронно-плотного содержимого цитоплазмы к периферии клетки и образование большого количества «гранулярных телец» в подавляющем большинстве клеток микоплазм в условиях стресса (табл. 2) могут быть связаны с процессом формирования мини-тел. В этом случае рибосомы, нуклеоид и запасные вещества концентрируются под поверхностью, одеваются в мембранный оболочку и выталкиваются наружу, отшнуровываясь от материнской клетки подобно почкам дрожжей (рис. 2, *a, б*). Подобные смещения содержимого цитоплазмы могут быть связаны и с увеличением продукции клетками экстраклеточных мембранных везикул (рис. 1, *в*). Не исключено, что мини-тела *A. laidlawii*, сохраняющие жизнеспособность в условиях стресса, являются аналогом спор спорообразующих бактерий.

Другие микоплазмы также образуют мини-тела в условиях стресса. Например, при культивировании *Mycoplasma gallisepticum* S6 на обедненной среде (без дрожжевого экстракта, эмбриональной сыворотки и глюкозы) при пониженной температуре микоплазменные клетки имеют меньший размер (0.15—0.2 мкм в диаметре) по сравнению с клетками, выросшими при оптимальных условиях культивирования. Они характеризуются утратой структур, подобных цитоскелету, и утратой терминальной органеллы. Такие клетки часто имеют коккоидную форму, электронно-плотную цитоплазму, их нуклеоид находится в конденсированном состоянии (Чернов и др., 2008; Trushin et al., 2010). При перенесении мини-тел *M. gallisepticum* в обычные клетки, как и у *A. laidlawii*. Показано формирование мини-тел и клетками *Mycoplasma hominis* (Trushin et al., 2010).

Весьма вероятно, образование мини-тел клетками микоплазм в неблагоприятных условиях является общим свойством всех представителей класса Mollicutes. Однако мини-тела *A. laidlawii*, уникальной микоплазмы с точки зрения адаптационных возможностей (Чернов и др., 2005; Windsor et al., 2010), вероятно, обладают повышенной устойчивостью за счет наличия в них мБТШ IbpA (Hsp20) (рис. 2, *г—е*). Подавляющее большинство микоплазм, гены которых полностью прочтены, за исключением *A. laidlawii* и еще трех фитоплазм, не имеют генов мБТШ (Вишняков, Борхсениус, 2013). Ранее мы показали, что при тепловом шоке значительно возрастает продукция IbpA клетками *A. laidlawii* (Борхсениус и др., 2008). При этом 65 % молекул IbpA, ассоциированных с клеточными структурами, локализуются в области «гранулярных телец» (Vishnyakov et al., 2012), которые могут выступать в роли кладовых клетки (Maniloff, 1970; Вишняков и др., 2010) и входят в состав мини-тел микоплазм (рис. 1, *б*; 2, *в*). При голодании также увеличивается количество IbpA в клетках *A. laidlawii* (Chernov et al., 2011a). Возможно, IbpA играет роль протектора для содержимого

мини-тел *A. laidlawii*. Например, известно, что комплексы мБТШ с субстратом отличаются высокой стабильностью и могут в течение недель храниться *in vitro* при комнатной температуре (Lee et al., 1997). При этом для того чтобы высвободить частично денатурированные и связавшиеся с мБТШ белки из таких комплексов, требуются АТФ-зависимые шапероны, такие как DnaK или GroESL (Narberhaus, 2002). Играет ли IbpA какую-то роль в упаковке белков и полипептидов, в том числе белковых факторов вирулентности, в своего рода zip-файлы, хранящиеся в «гранулярных тельцах» и распаковывающиеся при последующей реверсии мини-тел в обычные клетки, запуская важные клеточные процессы, еще предстоит выяснить.

Помимо предполагаемой защитной функции по отношению к запасным веществам клетки, которые, вероятно, содержатся в «гранулярных тельцах», IbpA может принимать участие в процессе формирования мини-тел (рис. 2, *г*). Например, белок CotM *Bacillus subtilis*, который относится к мБТШ по наличию в составе его молекулы альфа-криSTALLинового домена, участвует в формировании внешней оболочки спор бацилл, а в его отсутствие некоторые полипептиды, входящие в состав оболочки, становятся нестабильными и со временем утрачиваются (Henriques et al., 1997).

Активное образование мини-тел в условиях стресса должно обеспечивать успешную персистенцию представителей класса Mollicutes, а увеличение продукции клетками микоплазм экстраклеточных мембранных везикул, содержащих большое количество факторов вирулентности, — оказывать дополнительную нагрузку на инфицированный организм. При этом микоплазмы способны уходить от иммунного ответа (Razin, Hayflick, 2010), подавляя работу иммунной системы организма-хозяина (Rakovskaya et al., 1982; Chernov et al., 2011a), формировать биопленки, устойчивые к воздействию биогенных и абиогенных стрессовых факторов (McAuliffe et al., 2006), вызывать так называемые бессимптомные инфекции, не сопровождающиеся явными признаками заражения, однако провоцирующие реорганизацию транскриптома и протеома, а также изменения в ультраструктуре клеток инфицированного организма (Chernov et al., 2011a, 2012). Возможно, белок IbpA (Hsp20), обнаруженный как в экстраклеточных мембранных везикулах (Chenov et al., 2014), так и в мини-телах *A. laidlawii*, вносит вклад в повышенную устойчивость и патогенность этой микоплазмы, сохраняя белки и полипептиды, входящие в состав мини-тел и везикул, в том числе факторы вирулентности, в фолдинг-компетентном состоянии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-02070-а).

## Список литературы

- Борхсениус С. Н., Вишняков И. Е., Буданцева Е. В., Вонский М. С., Якобс Е., Лазарев В. Н. 2008. Белок теплового шока  $\alpha$ -криSTALLинового типа из микоплазмы (*Acholeplasma laidlawii*). Цитология. 50 (7) : 613—618. (Borcksenius S. N., Vishnyakov I. E., Budantseva E. V., Vonskii M. S., Jacobs E., Lazarev V. N. 2008.  $\alpha$ -Crystallin-type heat-shock protein from mycoplasma *Acholeplasma laidlawii* (Mollicutes). Cell Tissue Biol. (Цитология). 2 (4) : 360—365.)

Вишняков И. Е., Борхсениус С. Н. 2013. Белки теплового шока микоплазм и кодирующие их гены. Микробиология.

- 82 (6) : 643—659. (Vishnyakov I. E., Borchsenius S. N. 2013. Mycoplasma heat shock proteins and their genes. *Microbiologiya*. 82 (6) : 653—667.)
- Вишняков И. Е., Левицкий С. А., Лазарев В. Н., Айала Х. А., Иванов В. А., Снигиревская Е. С., Комиссарчик Я. Ю., Борхсенюс С. Н. 2010. Олигомерные формы, функции и локализация в клетке белка  $\alpha$ -кристаллического типа из микоплазмы. *Цитология*. 52 (11) : 938—945. (Vishnyakov I. E., Levitskii S. A., Lazarov V. N., Ayala J. A., Ivanov V. A., Snigirevskaia E. S., Komissarchik Ya. Yu., Borchsenius S. N. 2010. Oligomeric forms, functions and cellular localization of alpha-crystallin type protein from *Acholeplasma laidlawii*. *Tsitotologiya*. 52 (11) : 938—945.)
- Миронов А. А., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А. 1994. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука. 400 с. (Mironov A. A., Komissarchik Ya. Yu., Mironov V. A. 1994. Methods of electron microscopy in biology and medicine. St. Petersburg: Nauka. 400 p.)
- Музыкантов А. А., Баранова Н. Б., Медведева Е. С., Григорьева Т. Ю., Чернова О. А., Чернов В. М. 2014. Экспортируемые белки микоплазм: протеом экстраклеточных мембранных везикул *Acholeplasma laidlawii* PG8. ДАН. 455 (1) : 99—104. (Mouzykantov A. A., Baranova N. B., Medvedeva E. S., Grigor'eva T. Yu., Chernova O. A., Chernov V. M. 2014. Exported mycoplasmal proteins: proteome of extracellular membrane vesicles of *Acholeplasma laidlawii* PG8. Dokl. Biochem. Biophys. 455 : 43—48.)
- Серебренникова Л. А. 2005. Почва как возможная среда обитания фитопатогенных микоплазм: Автореф. канд. дис. М. 20 с. (Serebrennikova L. A. 2005. Soil as a possible habitat of phytopathogenic mycoplasmas. PhD Thesis. Moscow. 20 p.)
- Чернов В. М., Говорун В. М., Демина И. А., Горшков О. В., Музыкантов А. А., Шаймарданова Г. Ф., Чернова О. А. 2008. Адаптация микоплазм к неблагоприятным условиям роста: морфология, ультраструктура и экспрессия генома клеток *Mycoplasma gallisepticum* S6. ДАН. 421 (5) : 701—704. (Chernov V. M., Govorun V. M., Demina I. A., Gorshkov O. V., Muzykantov A. A., Shaimardanova G. F., Chernova O. A. 2008. Adaptation of mycoplasmas to adverse growth conditions: morphology, ultrastructure, and genome expression of *Mycoplasma gallisepticum* S6 cells. Dokl. Biochem. Biophys. 421 : 231—234.)
- Чернов В. М., Гоголев Ю. В., Попова Н. В., Чернова О. А. 1999. Генетическая изменчивость микоплазм (*Acholeplasma laidlawii*) при взаимодействии их с эукариотами (*Pisum sativum*). ДАН. 369 (2) : 275—277. (Chernov V. M., Gogolev Yu. V., Popova N. V., Chernova O. A. 1999. Genetic variability of mycoplasmas (*Acholeplasma laidlawii*) when they interact with eukaryotes (*Pisum sativum*). Dokl. RAS. 369 (2) : 275—277.)
- Чернов В. М., Мухаметшина Н. Е., Гоголев Ю. В., Абдрахимов Ф. А., Чернова О. А. 2005. Адаптивные реакции микоплазм *in vitro*: «живеспособные, но некультивируемые формы» и наноклетки *Acholeplasma laidlawii*. Микробиология. 74 (4) : 498—504. (Chernov V. M., Mukhametshina N. E., Gogolev Yu. V., Abdurakhimov F. A., Chernova O. A. 2005. Adaptive reactions of mycoplasmas *in vitro*: «viable but uncultivable forms» and nanocells of *Acholeplasma laidlawii*. Mikrobiologiya. 74 (4) : 428—433.)
- Чернов В. М., Мухаметшина Н. Е., Гоголев Ю. В., Нестерова Т. Н., Чернова О. А. 2007. Адаптация микоплазм к неблагоприятным условиям роста: нанотрансформация и фитопатогенность *Acholeplasma laidlawii* PG8. Докл. РАН. 413 (2) : 271—275. (Chernov V. M., Mukhametshina N. E., Gogolev Yu. V., Nesterova T. N., Chernova O. A. 2007. Mycoplasma adaptation to adverse growth conditions: nanotransformation and phytopathogenicity of *Acholeplasma laidlawii* PG8. Dokl. Biochem. Biophys. 413 : 57—60.)
- Chernov V. M., Chernova O. A., Medvedeva E. S., Mouzykantov A. A., Ponomareva A. A., Shaymardanova G. F., Gorshkov O. V., Trushin M. V. 2011a. Unadapted and adapted to starvation *Acholeplasma laidlawii* cells induce different responses of *Oryza sativa*, as determined by proteome analysis. J. Proteomics. 74 : 2920—2936.
- Chernov V. M., Chernova O. A., Mouzykantov A. A., Baranova N. B., Gorshkov O. V., Trushin M. V., Nesterova T. N., Ponomareva A. A. 2012. Extracellular membrane vesicles and phytopathogenicity of *Acholeplasma laidlawii* PG8. Sci. World J. 2012 : 315474. doi: 10.1100/2012/315474.
- Chernov V. M., Chernova O. A., Mouzykantov A. A., Efimova I. R., Shaymardanova G. F., Medvedeva E. S., Trushin M. V. 2011b. Extracellular vesicles derived from *Acholeplasma laidlawii* PG8. Sci. World J. 11 : 1120—1130.
- Chernov V. M., Moukhamedshina N. E., Gogolev Y. V., Nesterova T. N., Trushin M. V., Chernova O. A. 2007. *Acholeplasma laidlawii* PG8 culture adapted to unfavorable growth conditions shows an expressed phytopathogenicity. Sci. World J. 7 : 1—6.
- 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. 2014. Extracellular membrane vesicles secreted by mycoplasma *Acholeplasma laidlawii* PG8 are enriched in virulence proteins. J. Proteomics. doi: 10.1016/j.jprot.2014.07.020.
- Eb F., Orfila J., Lefebvre J. F. 1976. Ultrastructural study of the development of the agent of ewe's abortion. J. Ultrastruct. Res. 56 : 177—185.
- Freundt E. 1983. Culture media for classical mycoplasmas. In: Methods in mycoplasmatology. N.-Y.: Acad. Press. 1 : 127—136.
- Haylick L., Stanbridge E. 1967. Isolation and identification of mycoplasma from human clinical materials. Ann. New York: Acad. Sci. 143 : 608—621.
- Henriques A. O., Beall B. W., Moran C. P. 1997. CotM of *Bacillus subtilis*, a member of the  $\alpha$ -crystallin family of stress proteins, is induced during development and participates in spore outer coat formation. J. Bacteriol. 179 : 1887—1897.
- Jordan F. T., Amin M. M. 1980. A survey of Mycoplasma infections in domestic poultry. Res. Vet. Sci. 28 : 96—100.
- Lee E. Y., Choi D. Y., Kim D. K., Kim J. W., Park J. O., Kim S., Kim S. H., Desiderio D. M., Kim Y. K., Kim K. P., Gho Y. S. 2009. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. Proteomics. 9 : 5425—5436.
- Lee G. J., Roseman A. M., Saibil H. R., Vierling E. 1997. A small heat shock protein stably binds heat denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. EMBO J. 16 : 659—671.
- Maniloff J. 1970. Ultrastructure of *Mycoplasma laidlawii* during culture development. J. Bacteriol. 102 : 561—572.
- Maniloff J., Morowitz H. J., Barnett R. J. 1965. Studies of the ultrastructure and ribosomal arrangements of the pleuropneumonia-like organism A5969. J. Cell Biol. 25 : 139—150.
- McAuliffe L., Ellis R. J., Miles K., Ayling R. D., Nicholas R. A. 2006. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. Microbiology. 152 : 913—922.
- McBroom A. J., Kuehn M. J. 2007. Release of outer membrane vesicles by gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. Mol. Microbiol. 63 : 545—558.
- Medvedeva E. S., Baranova N. B., Mouzykantov A. A., Grigorieva T. Yu., Davydova M. N., Trushin M. V., Chernova O. A., Chernov V. M. 2014. Adaptation of mycoplasmas to antimicrobial agents: *Acholeplasma laidlawii* extracellular vesicles mediate the export of ciprofloxacin and a mutant gene related to the antibiotic target. Sci. World J.: dx.doi.org/10.1155/2014/150615.
- Narberhaus F. 2002.  $\alpha$ -Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. MMBR. 66 : 64—93.
- Neto R. L., Marques L. M., Guimarães A. M., Yamaguti M., Oliveira R. C., Gaetti-Jardim E. Jr., Medina A. O., Sanfilippo L. F., Timenetsky J. 2013. Frequency of different human mollicutes species in the mucosa of the oropharynx, conjunctiva, and genitalia of free-ranging and captive capuchin monkeys (*Cebus spp.*). Amer. J. Primatol. 75 : 973—978.
- Parsell D. A., Lindquist S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Ann. Rev. Genet. 27 : 437—496.
- Rakovskaya I. V., Sanin A. V., Konstantinova N. D., Ladygina V. G., Migoushina V. L., Tarshis M. A. 1982. Immunological

- and functional activity of spleen lymphocytes from mice infected by *Acholeplasma laidlawii* cells and Rauscher virus. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A. 251 : 545—553.
- Razin S., Hayflick L. 2010. Highlights of mycoplasma research — an historical perspective. *Biologicals*. 38 : 183—190.
- Razin S., Yogeve D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *MMBR*. 62 : 1094—1156.
- Trushin M. V., Chernov V. M., Gorshkov O. V., Baranova N. B., Chernova O. A. 2010. Atomic force microscopy analysis of DNA extracted from the vegetative cells and the viable, but non-cultivable, cells of two mycoplasmas (*Acholeplasma laidlawii* PG8 and *Mycoplasma hominis* PG37). *Sci. World J.* 10 : 894—900.
- Vishnyakov I. E., Levitskii S. A., Manuvera V. A., Lazarev V. N., Ayala J. A., Ivanov V. A., Snigirevskaya E. S., Komissar-
- chik Y. Y., Borchsenius S. N. 2012. The identification and characterization of IbpA, a novel  $\alpha$ -crystallin-type heat shock protein from mycoplasma. *Cell Stress Chaperones*. 17 : 171—180.
- Vromman F., Laverrière M., Perrinet S., Dufour A., Subtil A. 2014. Quantitative monitoring of the *Chlamydia trachomatis* developmental cycle using GFP-expressing bacteria, microscopy and flow cytometry. *PLoS ONE*. 9 : e99197.
- Windsor H. M., Windsor G. D., Noordergraaf J. H. 2010. The growth and long term survival of *Acholeplasma laidlawii* in media products used in biopharmaceutical manufacturing. *Biologicals*. 38 : 204—210.

Поступила 7 VIII 2014

## EFFECT OF HEAT SHOCK ON CELLS OF PHYTOPATHOGENIC MYCOPLASMA *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* PG-8A

*I. E. Vishnyakov,<sup>1,\*</sup> S. A. Levitskii,<sup>2</sup> S. N. Borchsenius<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and

<sup>2</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University; \* e-mail: innvish@gmail.com

Heat shock caused a more active formation of the «dormant» forms (minibodies), as well as increased production of extracellular membrane vesicles by *Acholeplasma laidlawii* PG-8A cells. Raise of the amount of the minibodies that have increased resistance to biogenic and abiogenic stress factors and pathogenicity may lead to more successful persistence of mycoplasmas in their hosts. Increased production of the extracellular membrane vesicles containing virulence factors by *Acholeplasma laidlawii* cells during stress may be an additional burden for the infected organism. It has been recently revealed that the vesicles of *A. laidlawii* contain appreciable quantities of small heat shock protein IbpA (Hsp20). In this paper, using immune-electron microscopy, have shown that at elevated temperature IbpA is associated with *A. laidlawii* minibodies. Perhaps, IbpA contributes to increased resistance and pathogenicity of the minibodies, keeping their proteins and polypeptides, including protein virulence factors in the folding-competent state.

**К e y w o r d s:** mycoplasmas, heat shock, minibodies, extracellular membrane vesicles, resistance to stress, virulence, small heat shock protein.