

ЖГУТИКИ ГАЛОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ: РАЗЛИЧИЯ В НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

©2014 г. А. С. СЮТКИН, М. Г. ПЯТИБРАТОВ,
О. В. ФЕДОРОВ

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Жгутиковая подвижность архей. III. Исследование структуры жгутиков архей. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших открытий биологии XX века стало выделение Архей, наряду с Эукариотами и Бактериями, в качестве одного из трех доменов живой природы. В отдельную ветвь жизни они были отнесены Карлом Вузом в 1977 году на основании сравнительного анализа 16S рРНК [1]. Многие представители данной группы организмов являются экстремофилами, то есть занимают экологические ниши с экстремальными значениями температур (термофилы и психрофилы), pH (ацидофилы и алкалофилы), солености (галофилы) и т.д. К настоящему времени археи также обнаружены в почве, океанах и пищеварительной системе животных и человека. Археи обладают как чертами схожими с бактериями и эукариотами, так и свойствами характерными только для данной группы организмов [2]. Одной из уникальных систем архей является аппарат жгутиковой подвижности, внеклеточная часть которого (филамент) внешне схожа с бактериальным аналогом и представляет собой протяженную спиральную нить. Тем не менее, данные структуры принципиально отличаются по архитектуре, механизму сборки и происхождению, при этом архейные жгутики имеют ряд общих свойств с бактериальными пиллями IV-го типа. В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что жгутики архей являются уникальной системой биологической подвижности, и в недавней работе было

Адрес для корреспонденции: fedorov@vega.protres.ru; bratov@vega.protres.ru

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 14-04-01604-а и № 14-04-31621-мол_а).

предложено называть их не жгутиками (flagella), а археллами (archaella) [3]. В связи с этим возникает вопрос, каким образом настолько различные органеллы как бактериальные и архейные жгутики формируют схожую надмолекулярную структуру?

Механизм спирализации бактериальных жгутиков был детально изучен на энтеробактериях, спиральный филамент которых строится из субъединиц единственного белка – флагеллина. Данный белок может в процессе косборочного сворачивания [4] принимать две конформации, названные L- и R-конформациями. При этом каждый продольный ряд протофиламентов состоит из флагеллина, находящегося в одной из этих конформаций. Так как длины протофиламентов, состоящих из флагеллина в L- и R-конформациях, несколько отличаются, при их взаимодействии в составе филамента возникают силы скручивания, приводящие к спирализации нити жгутика [5].

Интересен тот факт, что около 45% известных геномов бактерий, имеющих систему жгутиковой подвижности, имеют несколько копий флагеллиновых генов, что может указывать на селективные преимущества наличия дополнительных флагеллинов [6]. Количество генов флагеллинов у таких организмов варьирует от 2 (*Salmonella enterica*, серовар Typhimurium) до 15 (*Magnetococcus* sp. MC-1).

Исследования, проведенные на *Salmonella typhimurium*, имеющей два гена флагеллина, *fliC* и *fliB*, показали, что нить жгутика данного организма может строиться из продукта одного или другого гена. За смену белкового состава жгутика отвечает система фазовой вариации [7], включающая наряду с генами флагеллинов, ген белка-репрессора транскрипции гена *fliC* и ген инвертазы, контролирующей фазовую вариацию флагеллинов. Рекомбинационный механизм (сайт-специфическая инверсия сегмента, содержащего промотор) обеспечивает экспрессию только одного или другого флагеллина в каждый момент времени. Ген *fliB* находится в одном опероне с геном репрессора транскрипции гена *fliC*. Таким образом, в разных фазах жгутик *S. typhimurium* состоит из разных флагеллинов, что помогает данному патогенному организму избегать иммунного ответа хозяина за счет смены антигенных детерминант.

Геном другого микроорганизма *Caulobacter crescentus* имеет 6 флагеллиновых генов (*fliK, L, M, N, O, J*), причем белковые продукты каждого из генов содержатся в жгутиках дикого типа. Интересным свойством жгутиков этой бактерии является то, что различные участки филамента состоят из разных флагеллинов. С помощью делеционного анализа было показано, что каждый из флагеллинов, кроме FliJ, может в одиночку строить функциональный филамент. Кроме того,

было обнаружено, что нет строгих требований к порядку включения флагеллинов в растущий жгутик, и наблюдаемое распределение флагеллинов вдоль филамента скорее отражает регуляцию секреции флагеллинов [6]. Таким образом, данный организм имеет высокую избыточность по генам флагеллинов, смысл которой на данный момент остается непонятным.

В настоящее время жгутики архей, в сравнении с бактериальными аналогами, являются малоизученной структурой, как в плане строения, так и в плане функционирования. Однако, анализ геномных последовательностей показывает, что у архей наблюдается обратная ситуация – наличие лишь одного флагеллинового гена в геноме является исключительным случаем, а характерной является множественность структурного белка нити жгутика – флагеллина.

В предлагаемом обзоре мы рассмотрим результаты исследований роли множественности флагеллиновых генов, проводившихся в основном на галофильных археях. Полученные данные свидетельствуют, что механизм формирования спиральной нити жгутика может быть различным даже среди представителей родственных галоархей, при этом множественные флагеллины могут выполнять как структурную роль (когда каждый из них необходим для формирования полноценного функционального филамента), так и адаптивную роль (когда флагеллины могут замещать друг друга при изменении внешних условий).

II. ЖГУТИКОВАЯ ПОДВИЖНОСТЬ АРХЕЙ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

На данный момент в домене Архей описана подвижность только с использованием жгутиков (рис. 1), которые, как и у бактерий, выполняют функцию гребного винта, создавая гидродинамическое усилие [8].

Изначально полагали, что аппарат жгутиковой подвижности архей идентичен бактериальному, однако детальные исследования выявили между ними ряд фундаментальных отличий. Было показано, что: 1) жгутики архей существенно тоньше бактериальных и у них отсутствует внутренний канал, что указывает на принципиально иной механизм сборки; 2) белковые компоненты аппарата жгутиковой подвижности архей не имеют гомологии с компонентами системы жгутиковой подвижности бактерий, но при этом некоторые из них гомологичны белкам системы бактериальных пилей IV-го типа; 3) основной структурный белок жгутика архей – флагеллин синтези-

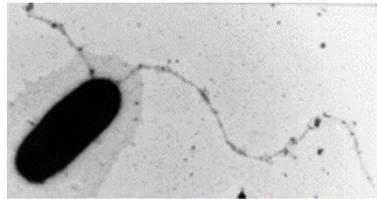


Рис. 1. Электронно-микроскопическая фотография клетки *H. salinarum* со жгутиками.

Масштабная линейка 500 нм.

руется в виде белка-предшественника с N-концевым сигнальным пептидом. На сегодняшний день очевидно, что бактериальные и архейные жгутики являются функциональными аналогами, но имеют различное происхождение и являются одним из примеров биологической конвергенции. На основании известных фактов был сделан вывод о том, что жгутики архей являются уникальным аппара-

татом биологической подвижности, и в недавней работе для них был предложен термин «архелла» (*archaella*, от *archaea* и *flagella*) [3], который пока не стал общепринятым [9].

Расположение архейных жгутиков на поверхности клетки может быть монополярным, биполярным или перитрихальным. Для галофильных архей характерно наличие пучков жгутиков, расположенных на полюсах клетки [8, 10]. Собственно филамент жгутика представляет собой нить толщиной 10–22 нм и длиной в несколько микрометров. В отличие от бактериальных жгутиков, у которых филамент может быть как право- так и левозакрученным, у архей на данный момент описаны только правозакрученные нити. Скорость движения архейных клеток варьирует в очень широких пределах – от 3 мкм/с для галофильных архей до ~600 мкм/с для некоторых представителей метаногенов. Интересен тот факт, что если рассматривать скорость движения организмов относительно их линейных размеров, то один из представителей метаногенов, а именно *Methanocaldococcus villosus*, в настоящий момент является рекордсменом по скорости среди всех известных организмов (500 длин тела в секунду) [11].

Кроме своей основной роли в обеспечении подвижности, архейные жгутики могут опосредовать такие функции как адгезию к абиотическим поверхностям, образование межклеточных контактов и, возможно, межклеточную коммуникацию [12, 13].

У Архей большая часть генов, кодирующих белки аппарата подвижности, находится в области так называемого *fla*-локуса (рис. 2). Данный локус, как правило, начинается с одной или нескольких копий гена основного структурного компонента жгутика – флагеллина (*FlaA/B* или *FlgA/B*). Гены флагеллинов могут транскрибироваться как отдельно, так и совместно с лежащими ниже *fla*-ассоциирован-

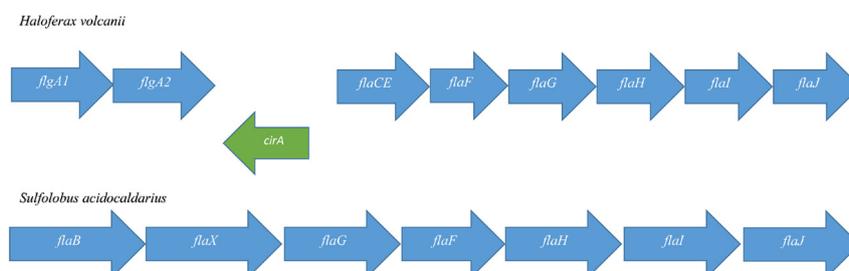


Рис. 2. Структура *fla*-локуса на примере *Haloferax volcanii* и *Sulfolobus acidocaldarius*.

ными генами. В целом, для архей (особенно для эвриархей) характерно наличие нескольких копий генов флагеллинов в геноме, которые в свою очередь могут быть организованы в один или несколько оперонов. При этом часть генов флагеллинов может располагаться на удалении от *fla*-локуса (*Halobacterium salinarum*) и даже на других репликациях (*Haloarcula marismortui*).

Кроме генов флагеллинов в области *fla*-локуса располагается набор так называемых *fla*-ассоциированных генов, которые транскрибируются совместно. Эксперименты по делеции данных генов показали, что каждый из них является критически необходимым для подвижности [14–16]. У эври- и кренархей (два основных царства Архей) набор генов данного кластера несколько отличается (рис. 2).

Гены *flaC* и *flaE* могут быть как отдельными, так и слитыми вместе (*Haloferax volcanii*), продукты данных генов являются мембранными белками. Ген *flaD* может находиться как в составе, так и на удалении (*H. volcanii*) от *fla*-локуса. На *H. salinarum* было показано, что продукты гена *flaCE* и гена *flaD* могут взаимодействовать с компонентами системы хемотаксиса, и таким образом участвовать в переключении направления вращения мотора [17]. У кренархей гены *flaC, D, E* отсутствуют, но присутствует ген *flaX*, отсутствующий у эвриархей [18]. В недавней работе было показано, что белок FlaX способен формировать олигомерную кольцеобразную структуру за счет С-концевых α -спиралей [19]. Кроме того, он образует стабильный комплекс с белком FlaI и, возможно, участвует в генерации вращательного момента мотором архейного жгутика. Относительно функций продуктов генов *flaF* и *flaG* на данный момент мало что известно.

Продукты генов *flaH*, *flaI*, и *flaJ*, как полагают, образуют секреторный комплекс, участвующий в сборке жгутика. Теоретический анализ

белка FlaH показал, что он имеет в своем составе типичный Walker A мотив, но неполный Walker B мотив, что может говорить о его возможной АТФазной активности. В структуре белка FlaJ предсказывается несколько трансмембранных участков, что указывает на то, что он является интегральным мембранным белком. Кроме того, в его структуре присутствуют 2 высоко заряженные цитоплазматические петли [18, 20]. Данный белок является гомологом консервативного мембранного белка PilC системы пилей IV-го типа *Pseudomonas aeruginosa* и, вероятно, непосредственно взаимодействует с белком FlaI [18]. Последний белок является АТФазой из суперсемейства секретирующих АТФаз, для которого была показана АТФазная активность *in vitro*, причем данная активность стимулировалась в присутствии липидов архейной мембраны. Предполагается, что данный белок снабжает энергией систему сборки жгутика [21].

Еще одним компонентом системы подвижности является расположенная в мембране сигнальная (лидерная) пептидаза (FlaK или PibD), ген которой располагается на удалении от *fla*-локуса. Роль сигнальной пептидазы сводится к отщеплению сигнального пептида от молекулы флагеллина, который синтезируется в виде белка-предшественника с сигнальным пептидом, схожим с таковым у пилинов IV-го типа [22–25]. Длина сигнального пептида у флагеллинов варьирует в диапазоне 6–16 аминокислотных остатков [26]. Генетические исследования показали, что удаление сигнального пептида является критически важным шагом в формировании аппарата подвижности [24, 27].

РЕГУЛЯЦИЯ СБОРКИ АППАРАТА ЖГУТИКОВОЙ ПОДВИЖНОСТИ АРХЕЙ

Сборка и функционирование жгутика являются крайне энергозатратными процессами для клетки, и, поэтому, находятся под строгим контролем регуляторных механизмов. Первым примером влияния условий внешней среды на синтез жгутиков у архей стало обнаружение того факта, что у *Methanocaldococcus jannaschii* и *Methanococcus marispaludis* индукция синтеза жгутиков происходит в условиях низкой концентрации водорода [28, 29]. Надо сказать, что данные организмы являются метаногенами и используют молекулярный водород как донор электронов в процессе метаногенеза, являющегося для них источником энергии. Таким образом, голодание является одним из факторов, вызывающим синтез жгутиков. Схожий эффект был обнаружен и на другом археоне – *Sulfolobus solfataricus*, у которого уровень транскрипции гена флагеллина сильно возрастал при достижении стационарной фазы роста или же в условиях голодания по азоту [30].

Изучение *fla*-оперона *Sulfolobus acidocaldarius* показало наличие двух промоторов [16]. Один промотор находился перед геном флагеллина (*flaB*), а второй перед геном *flaX*, с которого шла транскрипция генов *flaX-J*. Для данного организма, как и для родственного *S. solfataricus*, было обнаружено явление индукции синтеза жгутиков в условиях голодания. В данных условиях было зафиксировано усиление активации промотора, находящегося перед геном *flaB*, в то же время, второй промотор не показывал такого эффекта. Данные результаты указывают на то, что у *S. acidocaldarius* гены белков базального тела находятся под контролем конститутивного промотора, находящегося перед геном *flaX*, и, таким образом, продукты данных генов постоянно присутствуют в клетке. Следовательно, для того чтобы клетка начала активно двигаться необходим только синтез флагеллина, ген которого находится под контролем промотора, активируемого в условиях голодания. Такая система регуляции позволяет клетке быстро достроить аппарат подвижности и начать поиск более благоприятных условий. Дальнейшие исследования данной системы позволили идентифицировать ряд белков, регулирующих биосинтез аппарата подвижности [31, 32].

III. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ЖГУТИКОВ АРХЕЙ

МЕХАНИЗМЫ СБОРКИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НИТЕЙ ЖГУТИКОВ АРХЕЙ

На данный момент строение аппарата жгутиковой подвижности Архей, в сравнении с бактериальным аналогом, изучено крайне слабо. Бактериальный жгутик состоит из жесткого филамента, выполняющего роль гребного винта, мотора, создающего вращательное движение, и гибкого сочленения – крюка, передающего вращательный момент с мотора на филамент. У архей структуры, морфологически напоминающие бактериальный крюк, были идентифицированы только у метаногенов. Данная область выглядит как утолщение нити вблизи конца жгутика [33].

Базальные тела у архей были обнаружены при помощи электронной микроскопии образцов клеток и мембранных фракций, подвергнутых обработке неионным детергентом Triton X-114. У метаногенов *Methanospirillum hungatei* [34] и *Methanococcus thermolithotrophicus* [35] были описаны структуры, представляющие собой пару колец, соединенных стержнем, сходные с таковыми у грамположительных бактерий. Кроме того, при работе с *H. salinarum* удалось получить пучок жгутиков, прикрепленный к полярной кэп-структуре [36]. На срезах

клеток ей соответствовала дисковидная пластинчатая структура (ДПС) [37]. Было обнаружено, что пучок жгутиков проходит сквозь цитоплазматическую мембрану и упирается в ДПС – сложную электронноплотную структуру длиной 250–300 нм, расположенную на расстоянии 20 нм от мембраны [38, 39]. Предполагается, что по причине иного строения клеточной стенки у архей, необходимо наличие дополнительных структур, удерживающих жгутик. На данный момент точная структура и механизм функционирования мотора, создающего вращательное движение, остаются неизвестными. Для *H. salinarum* было показано, что вращение архейного мотора идет за счет энергии АТФ, в отличие от бактериального мотора, использующего энергию градиента протонов или ионов натрия [40].

В настоящее время идет активное изучение белков базального тела на модельном организме *Sulfolobus acidocaldarius*. В недавней работе было показано, что белок FlaI *in vitro* обладает АТФазной активностью, причем данная активность специфично стимулировалась при добавлении липидов архейной мембраны [21]. Кроме того, была обнаружена АТФ-зависимая олигомеризация данного белка с образованием гексамера диаметром 14 нм [41]. Проведенные исследования позволили сделать вывод о том, что именно белок FlaI отвечает за сборку и вращение филамента жгутика. Изучение другого компонента базального тела – белка FlaX, показало, что белок FlaXc (укороченный вариант белка FlaX) способен образовывать олигомерные кольца диаметром 30 нм *in vitro*. Кроме того, было обнаружено, что белок FlaX взаимодействует с белком FlaI за счет своего С-концевого региона [19]. Дальнейшие эксперименты показали способность белков FlaXc, FlaI и FlaH взаимодействовать друг с другом с образованием тройного комплекса [42]. На основании этих данных была предложена модель базального тела, согласно которой в качестве платформы для сборки мотора выступает политопный трансмембранный белок FlaJ, вокруг которого белок FlaX образует олигомерное кольцо диаметром 30 нм. Затем в данное кольцо входит гексамер, состоящий из белка FlaI, при этом данный гексамер способен образовывать дополнительные связи с белком FlaJ. С этим комплексом может связываться белок FlaH, выполняющий, по-видимому, функции связывания нуклеотидов и регуляции подвижности.

Основную часть жгутика составляет спиральный филамент, состоящий из множества копий одного или нескольких флагеллинов. Типичная толщина архейного филамента составляет 10–14 нм, длина – несколько микрометров. На основании электронно-микроскопических фотографий были построены реконструкции филаментов *H. salinarum*

и *Sulfolobus shibatae* [43–45]. В обоих случаях поверхностный домен флагеллинов формирует трехзаходную спираль, намотанную вокруг коровой части, в которой отсутствует внутренний канал. Внутренний кор консервативен по форме и размеру у обоих организмов и имеет толщину около 5 нм. Данный кор, по-видимому, образован гидрофобными α -спиралями N-концевых частей флагеллинов. Так как флагеллины архей имеют высококонсервативную область в 30–40 аминокислот на N-конце [22, 46, 47], предполагается, что такая структура коровой области является общей для всего домена Архей. В отличие от консервативного внутреннего домена, внешняя часть филамента у данных организмов отличается, что и приводит к различию в толщинах жгутиков – 14 нм у *S. shibatae* и 10 нм у *H. salinarum*. Отличия в данной области, по-видимому, отражают адаптацию организмов к специфическим условиям обитания [43, 45].

Надо отметить, что жгутики архей довольно устойчивы к диссоциирующим воздействиям и, в отличие от бактериальных, не способны к самосборке из отдельных субъединиц *in vitro*. Кроме того, в настоящее время нет ни одной решенной структуры флагеллинов архей. Для получения информации о структуре флагелинов архей были использованы косвенные методы анализа. С помощью сканирующей микрокалориметрии в нашей группе были проведены исследования доменной организации флагеллинов в составе филаментов *H. salinarum*, которые показали наличие единственного пика теплопоглощения, соответствующего кооперативному плавлению доменов, что говорит о том, что все пять флагеллинов данного организма имеют схожие термодинамические характеристики [48]. Тепловая денатурация флагеллиновых доменов имела необратимый характер, но не приводила к диссоциации нити жгутика. Плавление филаментов наблюдалось только в экспериментах с растворами филаментов при пониженной концентрации NaCl (10% и ниже), при работе с более высокими концентрациями соли, которые являются естественными для данного микроорганизма (20% NaCl), пик теплопоглощения не попадал в сканируемую область (до 130 °C), что говорит о высокой термостабильности филаментов. Интересные результаты с использованием сканирующей микрокалориметрии были получены для флагеллинов *Natronomonas* (ранее *Natronobacterium*) *pharaonis* [49]. Жгутики данного организма удавалось подвергнуть деполимеризации до отдельных субъединиц в присутствии неионного детергента Тритон X-100, при этом флагеллины сохраняли третичную структуру и плавилась кооперативно, хотя кривые плавления мономерных флагеллинов и филаментов отличались по форме, что может быть

связано с дестабилизацией третичной структуры флагеллинов после диссоциации. Данные результаты свидетельствовали о важной роли гидрофобных взаимодействий в формировании структуры жгутика. Как в случае жгутиков *H. salinarum*, так и *N. pharaonis* плавление доменов носило необратимый характер: повторное прогревание образцов не выявило процессов ренатурации [49].

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ФЛАГЕЛЛИНОВ АРХЕЙ

Одним из характерных свойств флагеллинов архей является наличие N-гликозилирования. Долгое время N-гликозилирование считалось отличительной чертой эукариот [50]. Однако после обнаружения N-гликозилирования белка поверхностного S-слоя и флагеллинов галофильного археона *H. salinarum* [51, 52] и последующих исследований выяснилось, что гликозилирование широко распространено среди архей [50].

Эксперименты по нарушению N-гликозилирования показали, что данный процесс не является жизненно необходимым для одних архей (для *H. volcanii* наблюдалось лишь снижение скорости роста), но критически важен для жизнедеятельности других (*S. acidocaldarius*) [53, 54]. В настоящее время считается, что данная посттрансляционная модификация позволяет белкам функционировать в суровых условиях окружающей среды, в которых зачастую обитают археи [50]. В этой связи интересно отметить, что количество сайтов, по которым проходит N-гликозилирование, а также структура присоединяемого гликана может меняться при изменении условий культивирования [55]. Данные результаты могут указывать на возможную роль N-гликозилирования в адаптации к меняющимся условиям окружающей среды.

Все флагеллины *M. voltae*, *M. maripaludis*, *H. salinarum* и *H. volcanii* являются гликопротеинами с N-типом гликозилирования [52, 53, 56–58]. Данный тип гликозилирования представляет собой многоступенчатый процесс. На первом этапе в цитоплазме на липидном переносчике собирается N-гликан путем последовательного добавления углеводных мономеров соответствующими гликозилтрансферазами. Затем данный гликан переносится через цитоплазматическую мембрану посредством пока неизвестного фермента. После этого N-гликан целиком переносится на остаток аспарагина молекулы флагеллина, входящий в сайт гликозилирования (N-X-S/T, где X – любая аминокислота кроме пролина), посредством олигосахарилтрансферазы AglB [59, 60]. Длина и строение присоединяемого гликана у разных видов может отличаться.

Анализ мутантных штаммов с делециями по генам *agl* (кодируют белки системы гликозилирования), которые приводили к укорочению цепей гликана, показал, что негликозилированные флагеллины и флагеллины, несущие гликаны, состоящие только из одного сахара, не формируют жгутики, как было показано на *M. voltae* и *M. maripaludis* [59, 60]. В случаях, когда гликаны состояли из 2–3 сахаров, клетки имели жгутики, но их подвижность на полужидкой среде была снижена, в сравнении с клетками дикого типа, несущими углеводные цепи нормальной длины (состоящие из 4-х мономеров). Большинство известных аминокислотных последовательностей архейных флагеллинов имеет в своем составе несколько сайтов N-гликозилирования, однако не все из этих сайтов соединены с олигосахаридами. Например, несмотря на наличие в аминокислотной последовательности флагеллина FlgA1 *H. volcanii* (мажорный флагеллин) шести сайтов N-X-S/T, экспериментально удалось подтвердить гликозилирование только для трех сайтов. С помощью сайт-направленного мутагенеза было показано, что все три сайта важны для сборки или функционирования жгутика, так как нарушение каждого из сайтов приводило к утрате подвижности на полужидкой среде [53]. Таким образом, все имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на то, что N-гликозилирование является посттрансляционной модификацией, критически важной для правильной сборки архейного жгутика.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МНОЖЕСТВЕННОСТИ ФЛАГЕЛЛИНОВЫХ ГЕНОВ У АРХЕЙ

Количество флагеллиновых генов у Архей варьирует в широких пределах, при этом множественность флагеллиновых генов распространена гораздо шире, чем у бактерий. Например, среди более 90 галоархей с известными геномными последовательностями около 25% не имеют флагеллиновых генов, 9% содержат по единственному гену флагеллина, у 43% имеется по два таких гена, а геномы остальных содержат от трех до шести флагеллиновых гена (рис. 3). Присутствие нескольких флагелинов в составе жгутиков было подтверждено уже в ранних работах по исследованию аппарата подвижности архей [61, 62]. С целью определения роли каждого из флагелинов в формировании филамента на ограниченном круге модельных организмов были проведены эксперименты по инактивации соответствующих генов как с помощью вставок, так и с помощью делеций. Среди галофильных архей для данных экспериментов первым был выбран галофильный археон *H. salinarum*. Геном данного организма содержит 6

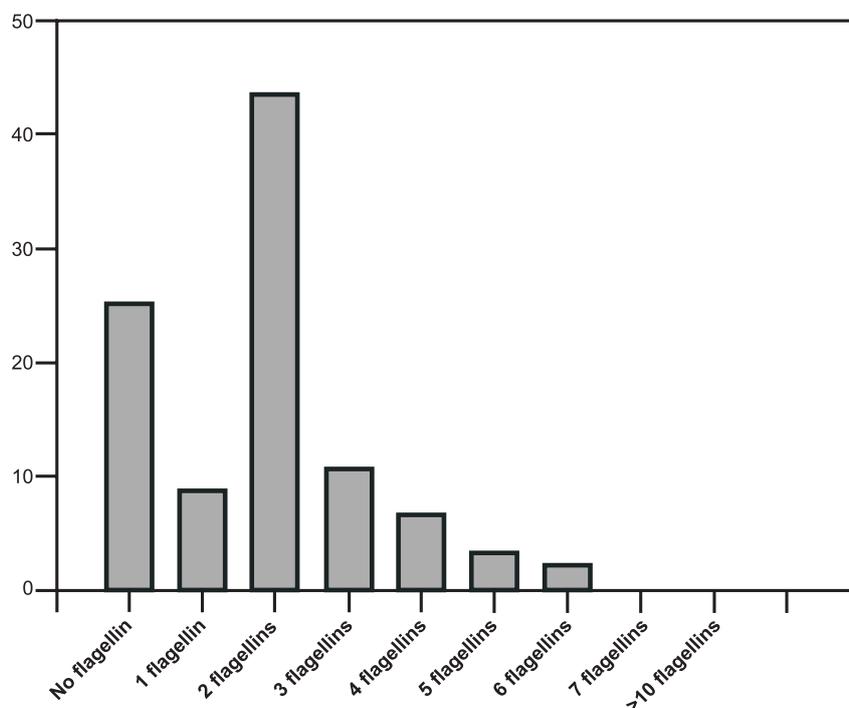


Рис. 3. Распределение по количеству флагеллиновых генов в геномах галоархей.

Анализ проводился для 91 вида галоархей с известными геномными последовательностями.

флагеллиновых генов (*flgA1, A2* образуют А-оперон, *flgB1, B2, B3* образуют В-оперон, кроме них присутствует ген *flgX*), однако, в составе жгутиков обнаружены продукты только первых пяти генов [62]. Первые эксперименты по выяснению роли каждого из флагеллинов проводились с помощью инактивации вставкой; так, инактивация *flgA2*-гена приводила к существенному снижению подвижности клеток, при этом формировались только прямые жгутики [63]. Кроме того, было показано, что в клетках данного мутантного штамма прекращалась транскрипция *flgB*-оперона. Дальнейшие исследования проводились с помощью делеционного подхода; полученные результаты показали, что при делеции каждого из генов *flgA*-оперона, как и в случае с инактивацией, наблюдались лишь жгутики прямой формы [64]. Как уже упоминалось в разделе I, спирализация бактериального жгутика осуществляется за счет способности единственного флагеллина

принимать два конформационных состояния – L или R. Результаты экспериментов по инактивации генов флагеллинов *H. salinarum* свидетельствуют о том, что у данного организма FlgA1- и FlgA2-флагеллины могут являться аналогами двух конформационных состояний единственного флагеллина бактерий. Было высказано предположение, что данный принцип надмолекулярной организации нитей жгутиков может являться общим для архей, поскольку для другого археона *Natrialba magadii*, филаменты которого построены из четырех различных флагеллинов, было обнаружено два иммунологически различных типа протофиламентов [65].

С использованием делеционного подхода также проводились исследования роли генов *flgB*-оперона *H. salinarum*. На поверхности клеток штамма с делецией A-оперона ($\Delta flgA$) наблюдались короткие изогнутые нити, состоящие из FlgB2-флагеллина. В то же время анализ мутантных штаммов, у которых присутствовал только *flgB1*- или *flgB3*-ген флагеллина показал, что на поверхности таких клеток изогнутые структуры отсутствовали, из чего был сделан вывод о том, что белки FlgB1 и FlgB3 не могут брать на себя роль в формировании изогнутых структур в отсутствие FlgB2-флагеллина [66]. На основании данных результатов было высказано предположение, что FlgB2-флагеллин формирует область крюка у *H. salinarum*. Однако, в недавней работе, с помощью поочередного выведения на поверхность флагеллинов FlgA1, FlgA2 и FlgB2 иммунодетектируемых пептидных петель, было показано, что FlgB2-флагеллин так же, как и флагеллины FlgA1 и FlgA2 равномерно распределен по длине филамента, а не локализован вблизи основания жгутика, как можно было бы ожидать для белка крюка [67, 68].

Роль множественности флагеллиновых генов изучалась также на представителях метаногенных архей. В экспериментах, выполненных в лаборатории К. Джаррелла, было показано, что инактивация генов флагеллинов приводила или к полной потере подвижности, или же к ее аномалиям [15]. Общим выводом из данных экспериментов являлось то, что продукт каждого гена необходим для нормальной подвижности архей. Однако роль множественности флагеллиновых генов так и осталась неясной. В этой связи интересно отметить существование группы организмов рода *Sulfolobus* (царство Кренархей), стоящей несколько особняком. Представители данного рода имеют всего один ген флагеллина и при этом подвижны [30, 69].

Особый интерес для изучения формирования жгутика представляет галофильный археон *Haloarcula marismortui*. Это обусловлено следующими причинами: 1) гены флагеллинов расположены на

различных репликалах – хромосоме и плазмиде; 2) массы флагеллинов, вычисленные по нуклеотидным последовательностям, значительно превосходят массы флагеллинов других архей [70]. Эти факты позволяют предположить, что принципы построения жгутика и регуляции биосинтеза флагеллинов у данного организма могут быть отличными от таковых для аппаратов подвижности ранее изученных архей. *H. marismortui* был выделен из Мертвого моря, его геном содержит полный набор генов системы подвижности [70], несмотря на то, что изначально этот микроорганизм был описан как не проявляющий ярко выраженной подвижности [71]. Кроме кластера *fla*-ассоциированных генов в геноме было аннотировано три гена флагеллина – *flaB*, расположенный на хромосоме I вблизи *fla*-локуса, *flaA1* – на хромосоме II и *flaA2* на плазмиде pNG100. Надо сказать, что такое расположение генов флагеллинов, когда каждый ген располагается на отдельном репликале, является крайне редким, и обычно все гены флагеллинов располагаются на основной хромосоме. Предполагаемые белковые продукты *flaA2*- и *flaB*-генов имеют длину около 450 аминокислотных остатков и обладают характерными чертами архейных флагеллинов, такими как наличие сигнального пептида (12 аминокислотных остатков) и высококонсервативный N-конец. FlaA2 и FlaB флагеллины *H. marismortui* гомологичны друг другу (идентичность 56%) и имеют два консервативных участка в области N- и C-концов. Центральная часть флагеллинов содержит несколько высоковариабельных участков, содержащих инсерции и делеции, и, по-видимому, не принимает участия в формировании межсубъединичных контактов, а определяет поверхностные свойства филаментов. Гипотетический белковый продукт *flaA1*-гена имел длину всего 84 аминокислотных остатка и не содержал сигнального пептида и, следовательно, был неспособен к секреции и формированию нити жгутика. Таким образом, в геноме *H. marismortui* имеется лишь два «полноценных» флагеллиновых гена.

При культивировании штамма *H. marismortui*, полученного из коллекции, были идентифицированы два штамма (фенотипа), у которых филаменты жгутиков отличались по белковому составу [72]. Эти различия проявлялись на электрофореграммах очищенных филаментов: для каждого из штаммов наблюдалось по единственной белковой полосе с близкой, но не совпадающей электрофоретической подвижностью.

Масс-спектрометрия соответствующих белковых полос показала, что из одного штамма выделялись филаменты, состоящие из FlaA2-флагеллина, а из другого – филаменты, состоящие из FlaB-флагеллина.

Молекулярные массы FlaA2- и FlaB-флагеллинов, рассчитанные из их аминокислотных последовательностей, составляют 47,4 (45,9) и 46,8 (45,4) кДа соответственно (в скобках приведены массы для зрелых белков, без сигнального пептида). Однако экспериментально определенные из электрофоретической подвижности молекулярные массы флагеллинов составляли около 70 кДа. Аномальная электрофоретическая подвижность флагеллинов галофильных архей отмечалась и ранее; она вызвана тем, что данные белки имеют высокое содержание карбоновых аминокислот [73], а также обусловлена наличием посттрансляционных модификаций, в частности гликозилирования [50, 56]. Полученные штаммы были условно названы FlaA2-штамм и FlaB-штамм. При культивировании в богатой питательной среде они были стабильны и не переходили друг в друга [72].

Существование двух штаммов, отличающихся белковым составом жгутиков, напоминает явление фазовой вариации, описанное для Энттеробактерий, у которых данный механизм служит способом защиты от иммунного ответа организма-хозяина [74]. Необходимо было установить, каким образом регулируется белковый состав филаментов у *H. marismortui*. Так как ген FlaA2-флагеллина располагается на плазмиде pNG100, было предположено, что возникновение FlaB-штамма является результатом утраты данной плазмиды. Для проверки этого предположения была проведена ПЦР с использованием двух пар праймеров к двум различным и удаленным друг от друга участкам плазмиды pNG100. Результаты экспериментов показали, что ПЦР-продукты отсутствовали при использовании в качестве матрицы ДНК FlaB-штамма, в то время как при использовании ДНК FlaA2-штамма ПЦР-продукты нарабатывались. Таким образом, штаммы FlaA2 и FlaB, являются штаммом дикого типа и штаммом, утратившим плазмиду pNG100, соответственно.

Дополнительным следствием приведенных выше результатов является тот факт, что жгутики, синтезируемые клетками FlaB-штамма, строятся исключительно из FlaB-флагеллина. В связи с этим было интересно проверить, идет ли синтез FlaB-флагеллина в клетках FlaA2-штамма, или же жгутики строятся исключительно из FlaA2-флагеллина. Для этого были получены антитела против FlaB-флагеллина, и с помощью иммуноблоттинга было показано, что жгутики, выделяющиеся из клеток FlaA2-штамма, содержали незначительную примесь FlaB-флагеллина [72]. Можно предположить, что плаزمида pNG100 несет в своем составе ген белка-репрессора, подавляющего (но не полностью) биосинтез FlaB-флагеллина в клетках FlaA2-штамма. Таким образом, белковый состав жгутиков

H. marismortui определяется плазмидой, что является первым фактом такого рода в домене Архей [75].

Электронная микроскопия препаратов FlaA2- и FlaB-филаментов показала, что они имели отчетливую спиральную форму. Толщина жгутиков, состоящих из FlaA2-флагеллина, составляла 20–22 нм, а состоящих из FlaB – 16–18 нм, что заметно больше толщин ранее изученных жгутиков Архей. Данные электронной микроскопии, вместе с тем фактом, что жгутики, выделяемые из клеток FlaB-штамма, состоят исключительно из FlaB-флагеллина, впервые продемонстрировали, что спиральный жгутик Эвриархей может строиться из единственного типа субъединиц. Данный факт особенно интересен тем, что ранее проведенные исследования филаментов ряда представителей царства Эвриархей показали, что для построения функционального спирального жгутика необходимо как минимум два флагеллина [15, 63]. Таким образом, несмотря на то, что флагеллины у Эвриархей являются достаточно близкородственными белками, они могут использовать разные принципы формирования нитей жгутиков.

Для сравнения подвижности FlaA2- и FlaB-штаммов клетки высевали на полужидкую агаризованную среду. Было обнаружено, что оба штамма образовали пятна вокруг точек посева, что говорит о том, что как FlaA2- так и FlaB-штамм являются подвижными, при этом диаметр пятна был почти в 2 раза больше для культуры FlaB-штамма. Так как скорости роста клеток обоих штаммов в жидкой среде примерно одинаковы, можно сделать вывод, что при данных условиях клетки FlaB-штамма обладают более высоким уровнем подвижности [72].

Для получения дополнительной информации о структуре филаментов, состоящих из FlaA2- и FlaB-флагеллина, был использован метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии в нативных солевых условиях. На полученных кривых плавления наблюдались два пика теплопоглощения при температурах: 72 °С (пик 1), 80 °С (пик 2) для FlaA2-жгутиков и 55 °С (пик 1), 84 °С (пик 2) для FlaB-жгутиков. Таким образом, FlaB-жгутики более чувствительны к повышению температуры, чем FlaA2.

Результаты по плавлению филаментов *H. marismortui* отличаются от данных, полученных для филаментов *H. salinarum*, все пять флагеллинов которых имеют сходные термодинамические свойства и на кривых плавления наблюдается единственный пик теплопоглощения, соответствующий одному домену [48]. Повторное прогревание как частично (пик 1), так и полностью (пик 2) денатурированных образцов жгутиков *H. marismortui* показало полную необра-

тимостью процесса тепловой денатурации. Подобно филаментам ранее исследованных галофильных архей, нити жгутиков *H. marismortui* не диссоциируют после прогрева.

Дальнейшие исследования, проводившиеся с использованием ограниченного протеолиза, показали, что в нативных солевых условиях филаменты *H. marismortui* устойчивы к воздействию трипсина. При обработке трипсином образцов, прогретых до 90 °С, быстрому расщеплению подвергается практически весь флагеллин с образованием ряда продуктов протеолиза. Для частично денатурированных (завершение плавления первого пика теплопоглощения) FlaB-филаментов наблюдается несколько иная картина: большая часть флагеллина (~80%) расщепляется за считанные минуты, в то время как некоторая часть остается нерасщепленной даже при больших временах инкубации. Данный результат указывает на то, что в составе FlaB-филаментов присутствуют две формы флагеллина FlaB: FlaB-r и FlaB-s, имеющие различную доступность к атаке трипсином. Сравнение электрофоретической подвижности не выявило каких-либо отличий между FlaB-r и FlaB-s, однако результаты анионообменной хроматографии показали, что в денатурирующих условиях эти формы не идентичны. При этом профили элюции двух форм имеют сложный характер, и, по-видимому, в свою очередь могут быть подразделены на несколько подформ [76]. Наблюдаемые различия, по-видимому, являются результатом посттрансляционных модификаций флагеллинов. Флагеллины Архей как правило являются гликопротеинами с N-типом гликозилирования, однако FlaA2- и FlaB-флагеллины *H. marismortui* не содержат канонических сайтов для N-гликозилирования N-X-S(T). Для проверки факта гликозилирования данных белков использовался метод детекции гликопротеинов с помощью окрашивания реагентом Шиффа и СНN-анализ, которые подтвердили, что флагеллины *H. marismortui* являются гликопротеинами [76]. При этом имеет место либо N-гликозилирование по неканоническому сайту, либо какой-то иной тип гликозилирования (например, O-гликозилирование). В последнее время появились публикации, свидетельствующие о случаях неканонического N-гликозилирования у эукариот [77], но для архей подобные случаи пока не описаны.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЖГУТИКОВ *HALORUBRUM LACUSPROFUNDI*

Изучение аппарата подвижности *H. marismortui* впервые продемонстрировало, что функциональный спиральный жгутик галофильных

архей может строиться только из одного флагеллина. Данный результат показал, что ранее обнаруженный принцип, когда для формирования спиральной нити необходимо как минимум два различных флагеллина, не является универсальным у Эвриархей. Но является ли *H. marismortui* в этом плане уникальным организмом, или же и другие галофильные археи могут формировать функциональный жгутик из субъединиц единственного белка? В последнее время резко выросло число архей с известными геномами, среди них есть и такие, геномы которых содержат единственный флагеллиновый ген. Один из таких организмов, *Halorubrum lacusprofundi*, был выбран в качестве объекта изучения. *H. lacusprofundi* выделен из гиперсоленого Глубокого озера (Deep Lake) в Антарктиде. По первоначальному описанию [78] данный организм является неподвижным и не синтезирует жгутики, при этом в геноме присутствует полный набор *fla*-ассоциированных генов, а также единственный ген флагеллина *flaB* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1202>). Предполагаемый белковый продукт этого гена имеет размер 243 аминокислотных остатка и содержит сигнальный пептид.

Полученная из коллекции культура данного археона была подвергнута нескольким раундам селекции на полужидкой агаризованной среде, в результате чего удалось получить клетки, обладающие заметным уровнем подвижности. Из данных клеток были выделены жгутики по стандартной методике. Электрофорез жгутиков *H. lacusprofundi* в ДСН–ПААГ показал наличие единственной белковой полосы, соответствующей (по данным масс-спектрометрии) продукту *flaB* гена флагеллина *H. lacusprofundi*. Электронная микроскопия препаратов жгутиков показала, что большая часть филаментов имеет отчетливую спиральную форму. При этом наблюдались полиморфные филаменты с различными амплитудой и шагом спирали, в том числе, кольцевые формы филаментов. Толщина филаментов составляла 10–11 нм. Дальнейшее изучение филаментов *H. lacusprofundi* с использованием анионообменной хроматографии позволило, как и в случае с *H. marismortui*, выделить несколько форм флагеллина, отличающихся своими зарядовыми характеристиками. Оказалось, что филаменты содержат как минимум две мажорные формы флагеллина. Относительное содержание форм флагеллина в составе филаментов оценивалось по сравнению площадей пиков на хроматограммах. На долю основной формы флагеллина приходится около 40% от суммарного белка [76]. Причиной данной гетерогенности флагеллина, как и в случае *H. marismortui*, вероятно, является наличие посттрансляционных модификаций. В отличие от

флагеллинов *H. marismortui*, флагеллин *H. lacusprofundi* содержит 6 канонических сайтов N-гликозилирования. Окрашивание данного белка реагентом Шиффа дало положительный результат [76]. Данные результаты являются дополнительным подтверждением того, что спиральные филаменты жгутиков галофильных архей могут строиться из единственного флагеллина, и обнаруженный нами для *H. marismortui* принцип не является уникальным.

На основании полученных данных, а также из общего принципа, согласно которому для формирования суперспирали необходимо, чтобы субъединицы, формирующие филамент, были неидентичны, можно предположить, что спирализация нити жгутиков *H. marismortui* и *H. lacusprofundi* может осуществляться за счет того, что флагеллины этих организмов могут находиться в различных конформациях. Косвенным подтверждением этого является тот факт, что субъединицы флагеллина в составе филаментов данных организмов не идентичны по своей доступности к атаке трипсином (для FlaB-флагеллина *H. marismortui*) и зарядовым характеристикам. При этом разница в зарядовых характеристиках может являться результатом различной степени посттрансляционных модификаций (гликозилирования) субъединиц флагеллина, вследствие их разной конформации.

РОЛЬ ИЗБЫТОЧНОСТИ ПО ГЕНАМ ФЛАГЕЛЛИНОВ У *H. MARISMORTUI*

Исследование аппарата подвижности *H. marismortui* показало, что спиральный и функциональный жгутик данного организма может строиться исключительно из субъединиц FlaB-флагеллина. Таким образом, оставалась неясной биологическая роль второго гена флагеллина (*flaA2*), расположенного на плазмиде. В этой связи представляют интерес работы, в которых исследовалась роль множественности генов 16S рРНК у *H. marismortui*. Геном данного организма содержит три гена 16S рРНК (*rrnA*, *rrnB* и *rrnC*) [70], причем гены *rrnA* и *rrnC* практически идентичны, а *rrnB* значительно от них отличался по нуклеотидной последовательности. Проведенные исследования показали, что ген *rrnB* не является жизненно необходимым [79] и, таким образом, геном *H. marismortui* имел избыточность по генам 16S рРНК. Исследование роли данной избыточности показало, что наличие гена *rrnB* является механизмом адаптации к изменению температуры окружающей среды [80]. С увеличением температуры культивирования уровень транскрипции *rrnB*-гена возрастал, и его продукт замещал продукты генов *rrnA/C*. Теоретический анализ показал, что кодируемая *rrnB* 16S рРНК обладала более

высокой термостабильностью, и, таким образом, наличие гена *rrnB* увеличивало норму реакции данного организма. Для таких генов, продукты которых выполняют одну и ту же функцию при различных условиях окружающей среды, был предложен термин «экопаралоги» [81]. Дальнейший анализ показал, что геном *H. marismortui* имеет значительный уровень избыточности – порядка ста генов были предложены в качестве возможных кандидатов в экопаралоги [81]. Надо также сказать, что гены флагеллинов *H. marismortui* не попали в данный список, возможно из-за того, что множественность флагеллиновых генов широко распространена среди архей. Данные факты указывали на то, что и избыточность флагеллиновых генов *H. marismortui* может являться механизмом адаптации, что косвенно подтверждали и результаты плавления филаментов, согласно которым жгутики, построенные из FlaA2-флагеллина, были существенно более термостабильны чем жгутики, построенные из FlaB-флагеллина [72].

Известно, что стабильность галофильных белков зависит от солёности среды. Для проверки предположения о том, что избыточность по генам флагеллинов *H. marismortui* является механизмом адаптации, подвижность FlaA2- и FlaB-штаммов сравнивали после роста на полужидкой агаризованной среде при различных значениях температур (40 °C и 50 °C) и солёностей (20%, 25% и 30%) (рис. 4). В условиях 20% солёности и 50 °C оба штамма не росли. Как видно из полученных результатов, клетки FlaB-штамма, в сравнении с клетками FlaA2-штамма, при повышении температуры или уменьшении солёности легче теряют подвижность. Однако при повышении концентрации соли подвижность клеток FlaB-штамма восстанавливалась. Интересен тот факт, что при 30% соли и 40 °C подвижность клеток FlaB-штамма оказалась заметно выше подвижности клеток FlaA2-штамма. Сниженная подвижность клеток FlaB-штамма при условиях низкой соли/высокой температуры может быть вызвана нарушением сборки жгутиков из FlaB-флагеллина. Для проверки данного предположения было проведено выделение жгутиков из клеток, росших в жидкой среде. Полученные препараты были проанализированы с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Согласно полученным результатам, в условиях, когда клетки FlaB-штамма неподвижны на полужидкой агаризованной среде, из клеточной суспензии также не выделяются жгутики. Неожиданным результатом оказалось то, что в условиях, когда подвижность клеток обоих штаммов на полужидкой агаризованной среде была сравнима, из культур, росших в жидкой среде, выход FlaB-жгутиков был существенно ниже выхода FlaA2 жгутиков (25% соли и 40 °C) или

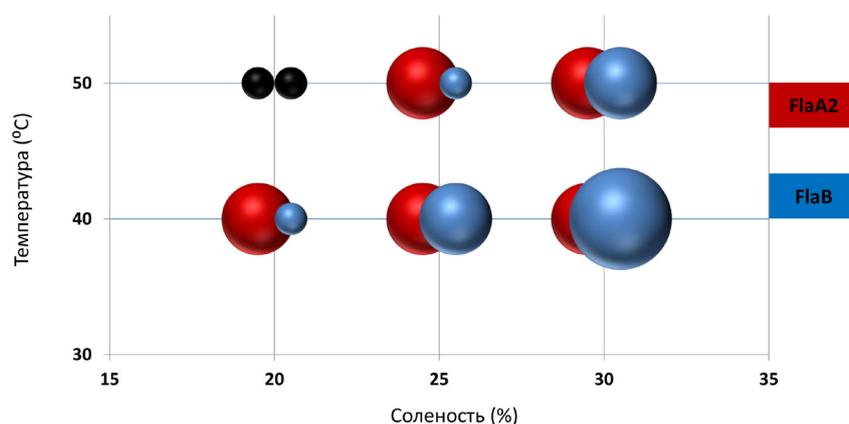


Рис. 4. Диапазон подвижности штаммов *H. marismortui* при различных условиях культивирования (температура, соленость).

же вовсе отсутствовал (30% соли и 50 °C). Этот результат может указывать на то, что гены флагеллинов при росте клеток в жидкой и на полужидкой средах регулируются по-разному [75]. Данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Как уже упоминалось, в препаратах жгутиков, выделенных из FlaA2-штамма, присутствует минорное количество FlaB-флагеллина, которое можно обнаружить с помощью иммуноблоттинга [72]. Препараты жгутиков, выделенные из клеток FlaA2-штамма, росших при разных условиях, были проверены на наличие примеси FlaB-флагеллина. Примесь FlaB-флагеллина не обнаруживалась в тех же условиях, при которых FlaB-жгутики не выделялись из клеток FlaB-штамма. Неясным оставался вопрос, является ли отсутствие FlaB-флагеллина результатом негативной регуляции его биосинтеза или же результатом того, что FlaB-флагеллин при определенных условиях не способен формировать жгутик. В группе профессора Родригеза-Валеры (Университет Мигеля Эрнандеса, Испания) было показано, что уровень транскрипции FlaB-флагеллина в клетках FlaA2-штамма при 50 °C в 3 раза выше по сравнению с 27 °C (соленость среды в обоих случаях составляла 25%) (Rodriguez-Valera, персональное сообщение). С помощью иммуноблоттинга было показано, что в препаратах жгутиков, выделенных из культуры FlaA2-штамма, росшего при 27 °C, есть примесь FlaB-флагеллина, в то время как в препарате, выделенном из культуры, росшей при 50 °C, она не детектировалась. Данный результат указывает на то, что отсутствие FlaB-флагеллина в препаратах жгутиков является результатом его неспособности

формировать жгутик при высоких температурах/низкой солености, а не результатом подавления его биосинтеза [75].

Полученные результаты подтвердили предположение о том, что избыточность по генам флагеллинов *H. marismortui* является механизмом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды, а сами гены являются экопаралогами [75]. Интересно то, что механизм реализации данной избыточности отличается от описанного ранее для генов 16S рРНК *H. marismortui*, соотношение между продуктами которых постепенно менялось при изменении температуры культивирования (но не солености). В нашем случае есть две крайние ситуации – филамент строится только из FlaB- или же из FlaA2-флагеллина (иногда с ничтожной примесью FlaB-флагеллина).

Как уже было сказано выше, археон *H. marismortui* выделен из Мертвого моря, представляющего собой бессточное солевое озеро. Интересным свойством данного водоема является то, что в зимнее время над ним проходят обильные дожди, при этом соленость воды вблизи поверхности может значительно снижаться [82]. Нить жгутика является внеклеточной структурой и, следовательно, в значительной степени подвержена колебаниям условий окружающей среды. В таких условиях (резкого снижения солености) селективное преимущество будет у клеток, имеющих плазмиду (FlaA2-штамм). При этом плазида pNG100, несущая ген FlaA2-флагеллина, по-видимому, выполняет роль своеобразного «переключателя», определяя белковый состав нитей жгутиков, причем распространение данной плазмиды в популяции клеток может происходить за счет горизонтального переноса [75]. В этой связи стоит отметить тот факт, что галофильные археи, как было показано в недавней работе, могут сливаться друг с другом с образованием как внутри-, так и межвидовых гибридов, что значительно облегчает обмен ДНК между клетками [83].

ИССЛЕДОВАНИЯ ФЛАГЕЛЛИНОВ *HALOFERAX VOLCANII*

Еще одним подтверждением многообразия механизмов, используемых различными археями для сборки функциональных жгутиков и регуляции этого процесса, являются результаты, полученные недавно в группе М. Полшредер (США) при изучении роли флагеллинов *Haloferax volcanii*. Галоархеон *H. volcanii* широко используется в качестве модельного организма для изучения биологии галоархей и наработки галофильных белков в препаративных количествах для структурных исследований [84]. Геном данного организма содержит два флагеллиновых гена *flgA1* и *flgA2*, организованных в один оперон, при этом стоп кодон *flgA1* отделен от стартового кодона *flgA2* 11

парами оснований. Для изучения роли каждого из флагеллинов в формировании жгутика была выполнена серия экспериментов на штаммах с делецией генов флагеллинов [10, 27, 53]. Исследование препарата жгутиков, выделенных из клеток дикого типа, показало, что основным компонентом филаментов является флагеллин FlgA1, а FlgA2 представлен в минорном количестве [53]. Распределение FlgA2 вдоль филаментов дикого типа, к сожалению, определено не было [10]. Делеция *flgA1* приводила к утрате клеточной подвижности. При этом согласно данным электронной микроскопии клетки сохраняли способность формировать филаменты из FlgA2, однако их количество резко снижалось. Жгутики обнаруживались только у 2% исследованных клеток по сравнению с 40% в контрольных образцах. Интересный результат был получен при исследовании штамма с делецией гена *flgA2*. Этот штамм неожиданно оказался гиперподвижным по сравнению с штаммом дикого типа. При его выращивании на полужидком агаре диаметр пятна, сформировавшегося вокруг точки посева, был вдвое больше, чем для дикого типа (при сопоставимой скорости роста клеток). При этом клетки штамма с делецией *flgA2* имели больше жгутиков (3–5 на клетку, по сравнению с 1–2 у дикого типа), а длина жгутиков была почти в 3 раза больше, чем у дикого типа. Интересно, что при экспрессии в этом штамме гена *flgA2*, встроенного в плазмиду с триптофан-индуцируемым промотором, гиперподвижность сохранялась. Этот результат может свидетельствовать, что возможная регуляторная роль FlgA2 зависит от относительного содержания FlgA1. Кроме того, в экспериментах по комплементации мутантного штамма с делецией всего флагеллинового оперона плазмидой, содержащей только ген *flgA1* или оба флагеллиновых гена, подвижность восстанавливалась только при экспрессии обоих генов. Результаты, полученные на *H. volcanii*, продемонстрировали, что функциональные спиральные филаменты этого микроорганизма, как и в случае *H. marismortui* и *H. lacusprofundi*, могут формироваться из продукта единственного флагеллинового гена, а FlgA2 играет как структурную, так и регуляторную роль в обеспечении жгутиковой подвижности. Авторы высказывают предположение, что при определенных условиях FlgA2 может выступать в качестве негативного регулятора сборки филамента, но не напрямую, а опосредованно, связываясь с неизвестным положительным регулятором флагеллинового оперона [10].

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Жгутики бактерий и архей являются принципиально разными структурами, схожими лишь внешне. Данное внешнее сходство вызвано тем, что жгутики бактерий и архей являются функциональными аналогами, и для работы в качестве гребного винта они должны быть спиральными. Механизм спирализации бактериальных филаментов был изучен в деталях, и был сделан вывод о том, что для спирализации нити жгутика субъединицы флагеллина должны быть структурно неидентичны. В то же время, аппарат жгутиковой подвижности архей является крайне слабо изученным, и представляет интерес, каким образом столь различные органеллы способны формировать схожую надмолекулярную структуру. Проведенные ранее исследования аппарата подвижности галофильного археона *H. salinarum* показали, что для спирализации нити жгутика данного организма необходимы как минимум два различных флагеллина, из чего был сделан вывод о том, что у данного организма два флагеллина могут быть аналогами двух конформационных состояний единственного флагеллина Энтробактерий. Так как множественность флагеллиновых генов широко распространена среди архей, было выдвинуто предположение о том, что данный принцип является универсальным в домене Архей.

В ходе недавних исследований, которые были выполнены на *H. volcanii*, *H. marismortui* и *H. lacusprofundi*, было обнаружено, что спиральные и функциональные жгутики данных архей могут строиться только из одного типа субъединиц [10, 75, 76], и, таким образом, механизмы формирования спиральности жгутиков галофильных Архей являются более разнообразными, чем считалось ранее. Были получены результаты, которые существенно расширили существовавшие ранее представления о роли множественных флагеллинов архей. Так, впервые было показано, что множественность флагеллиновых генов у архей может быть механизмом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды и использоваться при регуляции сборки жгутиков [10, 75].

На данный момент механизм построения спиральной надмолекулярной структуры, каковой является нить жгутика архей, остается неизвестным. Однако, на основании полученных данных, а также из общего принципа, согласно которому для формирования суперспирали необходимо, чтобы субъединицы, формирующие филамент, были неидентичны, мы можем предположить, что спирализация нитей жгутиков *H. volcanii*, *H. marismortui* и *H. lacusprofundi* может осуществляться за счет того, что флагеллины данных организмов могут находиться в различных конформациях. В настоящее время, из-за

отсутствия данных о детальной пространственной структуре флагеллина в составе архейных жгутиков, вопрос о точном механизме спирализации филамента остается открытым.

Выяснение принципов формирования надмолекулярных структур является одной из важнейших задач современной биологии. Жгутики бактерий и архей являются, возможно, самыми удобными объектами для изучения этой проблемы. Как видно из обзора, сборка этих внешних клеточных структур происходит различными способами, но приводит к одному результату – формированию жесткой спиральной структуры, с совершенством выполняющей предназначенную функцию. Выявление общих и частных особенностей механизма сборки позволит наиболее полно изучить эту молекулярно-биологическую проблему и сделать полезные выводы. Так, например, общее для флагеллинов бактерий и архей свойство иметь высококонсервативные концевые участки полипептидной цепи в случае бактериального флагеллина привело к описанию косборочного сворачивания белка, а у архей – к выделению домена, формирующего внешнюю поверхность жгутика. Понимание взаимосвязи между свойствами индивидуальных субъединиц и формируемой ими надмолекулярной структуры позволит целенаправленно изменять свойства природных ансамблей субъединиц. Прокариотические жгутики рассматриваются в качестве одного из наиболее перспективных объектов для создания на их основе искусственных нановолокон, обладающих заданными свойствами [67, 85]. Археи в этом плане представляют особый интерес, так как данные организмы обитают в экстремальных условиях, и, как следствие, формируемые ими структуры обладают повышенной устойчивостью к диссоциирующим воздействиям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Woese, C. R., Fox, G. E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5088–5090.
2. Воробьева, Л. И. (2007) *Археи*. Москва: ИКЦ «Академкнига», 447 с.
3. Jarrell, K. F. and Albers, S. V. (2012) The archaellum: an old motility structure with a new name, *Trends in Microbiology*, **20**, 307–312.
4. Федоров, О. В. (1998) Косборочное сворачивание белков как механизм формирования надмолекулярной структуры, *Успехи биологической химии*, **38**, 239 – 256.
5. Calladine, C. R. (1978) Change of waveform in bacterial flagella: the role of mechanics at the molecular level, *Journal of Molecular Biology*, **118**, 457–479.
6. Faulds-Pain, A., Birchall, C., Aldridge, C., Smith, W. D., Grimaldi, G., Nakamura, S., Miyata, T., Gray, J., Li, G., Tang, J.X., Namba, K., Minamino, T., Aldridge, P. D. (2011) Flagellin redundancy in *Caulobacter crescentus* and its implications for flagellar filament assembly, *Journal of Bacteriology*, **193**, 2695–2707.

7. Silverman, M., Zieg, J., Hilmen, M., Simon, M. (1979) Phase variation in *Salmonella*: genetic analysis of a recombinational switch, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 391–395.
8. Alam, M., Oesterhelt, D. (1984) Morphology, function and isolation of halobacterial flagella, *Journal of Molecular Biology*, **176**, 459–475.
9. Wirth, R. (2012) Response to Jarrell and Albers: seven letters less does not say more, *Trends in Microbiology*, **20**, 511–512.
10. Tripepi, M., Esquivel, R. N., Wirth, R., Pohlschroder, M. (2013) *Haloferax volcanii* cells lacking the flagellin FlgA2 are hypermotile, *Microbiology*, **159**, 2249–2258.
11. Herzog, B. and Wirth, R. (2012) Swimming behavior of selected species of Archaea, *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 1670–1674.
12. Nather, D. J., Rachel, R., Wanner, G., Wirth, R. (2006) Flagella of *Pyrococcus furiosus*: multifunctional organelles, made for swimming, adhesion to various surfaces, and cell-cell contacts, *Journal of Bacteriology*, **188**, 6915–6923.
13. Jarrell, K. F., Ding, Y., Nair, D. B., Siu, S. (2013) Surface appendages of archaea: structure, function, genetics and assembly, *Life*, **3**, 86–117.
14. Patenge, N., Berendes, A., Engelhardt, H., Schuster, S.C., Oesterhelt, D. (2001) The *fla* gene cluster is involved in the biogenesis of flagella in *Halobacterium salinarum*, *Molecular Microbiology*, **41**, 653–663.
15. Chaban, B., Ng, S. Y., Kanbe, M., Saltzman, I., Nimmo, G., Aizawa, S. I., Jarrell, K. F. (2007) Systematic deletion analyses of the *fla* genes in the flagella operon identify several genes essential for proper assembly and function of flagella in the archaeon, *Methanococcus maripaludis*, *Molecular Microbiology*, **66**, 596–609.
16. Lassak, K., Neiner, T., Ghosh, A., Klingl, A., Wirth, R., Albers, S. (2012) Molecular analysis of the crenarchaeal flagellum, *Molecular Microbiology*, **83**, 110–124.
17. Schlesner, M., Miller, A., Streif, S., Staudinger, W. F., Müller, J., Scheffer, B., Oesterhelt, D. (2009) Identification of Archaea-specific chemotaxis proteins which interact with the flagellar apparatus, *BMC Microbiology*, **9**, 56.
18. Ghosh, A. and Albers, S. V. (2011) archaeal flagellum, *Biochemical Society Transactions*, **39**, 64–69.
19. Banerjee, A., Ghosh, A., Mills, D. J., Kahnt, J., Vonck, J., Albers, S. V. (2012) FlaX, a unique component of the crenarchaeal archaeum, forms oligomeric ring-shaped structures and interacts with the motor ATPase FlaI, *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 43322–43330.
20. Thomas, N. A. and Jarrell, K. F. (2001) Characterization of flagellum gene families of methanogenic archaea and localization of novel flagellum accessory proteins, *Journal of Bacteriology*, **183**, 7154–7164.
21. Ghosh, A., Hartung, S., van der Does, C., Tainer, J. A., Albers, S. V. (2011) Archaeal flagellar ATPase motor shows ATP-dependent hexameric assembly and activity stimulation by specific lipid binding, *Biochemical Journal*, **437**, 43–52.
22. Kalmokoff, M. L. and Jarrell, K. F. (1991) Cloning and sequencing of a multigene family encoding the flagellins of *Methanococcus voltae*, *Journal of Bacteriology*, **173**, 7113–7125.
23. Bardy, S. L. and Jarrell, K. F. (2002) FlaK of the archaeon *Methanococcus maripaludis* possesses preflagellin peptidase activity, *FEMS Microbiology Letters*, **208**, 53–59.
24. Bardy, S. L. and Jarrell, K. F. (2003) Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon

- Methanococcus voltae*, *Molecular Microbiology*, **50**, 1339–1347.
25. Szabo, Z., Albers, S. V., Driessen, A. J. M. (2006) Active-site residues in the type IV prepilin peptidase homologue PibD from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*, *Journal of Bacteriology*, **188**, 1437–1443.
 26. Ng, S. Y., Chaban, B., Jarrell, K. F. (2006) Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: a comparison of genes and posttranslational modifications, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **11**, 167–191.
 27. Tripepi, M., Imam, S., Pohlschroder, M. (2010) *Haloferax volcanii* flagella are required for motility but are not involved in PibD-dependent surface adhesion, *Journal of Bacteriology*, **192**, 3093–3102.
 28. Mukhopadhyay, B., Johnson, E. F., Wolfe, R. S. (2000) A novel pH2 control on the expression of flagella in the hyperthermophilic strictly hydrogenotrophic methanarchaeon *Methanococcus jannaschii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 11522–11527.
 29. Hendrickson, E. L., Liu, Y., Rosas-Sandoval, G., Porat, I., Soll, D., Whitman, W. B., Leigh, J. A. (2008) Global responses of *Methanococcus maripaludis* to specific nutrient limitations and growth rate, *Journal of Bacteriology*, **190**, 2198–2205.
 30. Szabo, Z., Sani, M., Groeneveld, M., Zolghadr, B., Schelert, J., Albers, S. V., Driessen, A. J. (2007) Flagellar motility and structure in the hyperthermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*, *Journal of Bacteriology*, **189**, 4305–4309.
 31. Reimann, J., Lassak, K., Khadouma, S., Ettema, T. J., Yang, N., Driessen, A. J., Klingl, A., Albers, S. V. (2012) Regulation of archaeella expression by the FHA and von Willebrand domain-containing proteins ArnA and ArnB in *Sulfolobus acidocaldarius*, *Molecular Microbiology*, **86**, 24–36.
 32. Lassak, K., Peeters, E., Wrobel, S., Albers, S. V. (2013) The one-component system ArnR: a membrane-bound activator of the crenarchaeal archaeellum, *Molecular Microbiology*, **88**, 125–139.
 33. Thomas, A. N., Bardy, B. L., Jarrell, K. F. (2001) The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure, *FEMS Microbiology Reviews*, **25**, 147–174.
 34. Kalmokoff, M. L., Jarrell, K. F., Koval, S. F. (1988) Isolation of flagella from the archaeobacterium *Methanococcus voltae* by phase separation with Triton X-114, *Journal of Bacteriology*, **170**, 1752–1758.
 35. Cruden, D., Sparling, R. and Markovetz, A. J. (1989) Isolation and ultrastructure of the flagella of *Methanococcus thermolithotrophicus* and *Methanospirillum hungatei*, *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 1414–1419.
 36. Kupper, J., Marwan, W., Typke, D., Grunberg, H., Uwer, U., Gluch, M., Oesterhelt, D. (1994) The flagellar bundle of *Halobacterium salinarum* is inserted into a distinct polar cap structure, *Journal of Bacteriology*, **176**, 5184–5187.
 37. Бакеева, Л. Е., Метлина, А. Л., Новикова, Т.М., Сперанский, В.В. (1992) Ультраструктура двигательного аппарата *Halobacterium salinarum*, *Доклады Академии Наук*, **326**, 914–915.
 38. Метлина, А. Л. (2001) Жгутики прокариот как система биологической подвижности, *Успехи биологической химии*, **41**, 229–282.
 39. Метлина, А. Л. (2004) Жгутики бактерий и архей как органеллы подвижности прокариот, *Биохимия*, **69**, 1477–1488.
 40. Streif, S., Staudinger, W. F., Marwan, W., Oesterhelt, D. (2008) Flagellar rotation in the archaeon *Halobacterium salinarum* depends on ATP, *Journal of Molecular Biology*, **384**, 1–8.

41. Reindl, S., Ghosh, A., Williams, G. J., Lassak, K., Neiner, T., Henche, A. L., Albers, S. V., Tainer, J. A. (2013) Insights into Flal functions in archaeal motor assembly and motility from structures, conformations, and genetics, *Molecular Cell*, **49**, 1069–1082.
42. Banerjee, A., Neiner, T., Tripp, P., Albers, S. V. (2013) Insights into subunit interactions in the *Sulfolobus acidocaldarius* archaellum cytoplasmic complex, *FEBS Journal*, **280**, 6141–6149.
43. Cohen-Krausz, S., Trachtenberg, S. (2002) The structure of the archaeobacterial flagellar filament of the extreme halophile *Halobacterium salinarum* RIM1 and its relation to eubacterial flagellar filaments and type IV pili, *Journal of Molecular Biology*, **321**, 383–395.
44. Trachtenberg, S., Galkin, V. E., Egelman, E. H. (2005) Refining the Structure of the *Halobacterium salinarum* flagellar filament using the iterative helical real space reconstruction method: insights into polymorphism, *Journal of Molecular Biology*, **346**, 665–676.
45. Cohen-Krausz, S., Trachtenberg, S. (2008) The flagellar filament structure of the extreme acidothermophile *Sulfolobus shibatae* B12 suggests that archaeobacterial flagella have a unique and common symmetry and design, *Journal of Molecular Biology*, **375**, 1113–1124.
46. Kalmokoff, M. L., Karnauhow, T. M., Jarrell, K. F. (1990) Conserved N-terminal sequences in the flagellins of archaeobacterial, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **167**, 154–160.
47. Bardy, S. L., Eichler, J., Jarrell, K. F. (2003) Archaeal signal peptides — a comparative survey at the genome level, *Protein Science*, **12**, 1833–1843.
48. Tarasov, V. Y., Kostyukova, A. S., Tiktopulo, E. I., Pyatibratov, M. G., Fedorov, O. V. (1995) Unfolding of tertiary structure of *Halobacterium halobium* flagellins does not result in flagella destruction, *Journal of Protein Chemistry*, **14**, 27–31.
49. Пятибратов, М. Г., Костюкова, А. С., Тарасов, В. Ю., Федоров, О. В. (1996) О некоторых принципах формирования структуры жгутиков галоалкалофильных архей, *Биохимия*, **61**, 1489–1497.
50. Calo, D., Kaminski, L., Eichler, J. (2010) Protein glycosylation in Archaea: sweet and extreme, *Glycobiology*, **20**, 1065–1076.
51. Mescher, M. F., Strominger, J. L. (1976) Purification and characterization of a prokaryotic glucoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarum*, *Journal of Biological Chemistry*, **251**, 2005–2014.
52. Sumper, M. (1987) Halobacterial glycoprotein biosynthesis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, **906**, 69–79.
53. Tripepi, M., You, J., Temel, S., Onder, O., Brisson, D., Pohlschroder, M. (2012) N-glycosylation of *Haloferax volcanii* flagellins requires known Agl proteins and is essential for biosynthesis of stable flagella, *Journal of Bacteriology*, **194**, 4876–4887.
54. Meyer, B. H., Albers, S. V. (2014) AglB, catalyzing the oligosaccharyl transferase step of the archaeal N-glycosylation process, is essential in the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*, *MicrobiologyOpen*, **3**, 531–543.
55. Guan, Z., Naparstek, S., Calo, D., Eichler, J. (2012) Protein glycosylation as an adaptive response in Archaea: growth at different salt concentrations leads to alterations in *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein N-glycosylation, *Environmental Microbiology*, **14**, 743–753.
56. Wieland, F., Paul, G., Sumper, M. (1985) Halobacterial flagellins are sulfated glycoproteins, *Journal of Biological Chemistry*, **260**, 15180–15185.

57. Voisin, S., Houlston, R. S., Kelly, J., Brisson, J. R., Watson, D., Bardy, S. L., Jarrell, K. F., Logan, S. M. (2005) Identification and characterization of the unique N-linked glycan common to the flagellins and S-layer glycoprotein of *Methanococcus voltae*, *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 16586–16593.
58. Kelly, J., Logan, S. M., Jarrell, K. F., Vandyke, D. J., Vinogradov, E. (2009) A novel N-linked flagellar glycan from *Methanococcus maripaludis*, *Carbohydrate Research*, **344**, 648–653.
59. Chaban, B., Voisin, S., Kelly, J., Logan, S. M., Jarrell, K. F. (2006) Identification of genes involved in the biosynthesis and attachment of *Methanococcus voltae* N-linked glycans: insight into N-linked glycosylation pathways in Archaea, *Molecular Microbiology*, **61**, 259–268.
60. Vandyke, D. J., Wu, J., Logan, S. M., Kelly, J. F., Mizuno, S., Aizawa, S. I., Jarrell, K. F. (2009) Identification of genes involved in the assembly and attachment of a novel flagellin N-linked tetrasaccharide important for motility in the archaeon *Methanococcus maripaludis*, *Molecular Microbiology*, **72**, 633–644.
61. Gerl, L., Sumper, M. (1988) Halobacterial flagellins are encoded by a multigene family. Characterization of five flagellin genes, *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 13246–13251.
62. Gerl, L., Deutzmann, R., Sumper, M. (1989) Halobacterial flagellins are encoded by a multigene family. Identification of all five gene products, *FEBS Letters*, **244**, 137–140.
63. Tarasov, V. Y., Pyatibratov, M. G., Tang, S. L., Dyal-Smith, M., Fedorov, O. V. (2000) Role of flagellins from A and B loci in flagella formation of *Halobacterium salinarum*, *Molecular Microbiology*, **35**, 69–78.
64. Тарасов, В. Ю., Пятибратов, М. Г., Безносков, С. Н., Федоров, О. В. (2004) О надмолекулярной организации филаменты жгутиков архей, *Доклады Академии Наук*, **396**, 835–837.
65. Pyatibratov, M. G., Leonard, K., Tarasov, V. Y., Fedorov, O. V. (2002) Two immunologically distinct types of protofilaments can be identified in *Natrialba magadii* flagella, *FEMS Microbiology Letters*, **212**, 23–27.
66. Безносков, С. Н., Пятибратов, М. Г., Федоров, О. В. (2007) О мультикомпонентности жгутиков *Halobacterium salinarum*, *Микробиология*, **76**, 494–501.
67. Безносков, С. Н., Пятибратов, М. Г., Федоров, О. В. (2009) Жгутики архей как матрицы для создания новых наноматериалов, *Российские Нанотехнологии*, **4**, 94–98.
68. Beznosov, S. N., Pyatibratov, M. G., Veluri, P. S., Mitra, S., Fedorov, O. V. (2013) A way to identify archaeal flagellins in *Halobacterium salinarum* archaeella by FLAG-tagging, *Central European Journal of Biology*, **8**, 828–834.
69. Lewus, P., Ford, R. M. (1999) Temperature-sensitive motility of *Sulfolobus acidocaldarius* influences population distribution in extreme environments, *Journal of Bacteriology*, **181**, 4020–4025.
70. Baliga, N. S., Bonneau, R., Facciotti, M. T., Pan, M., Glusman, G., Deutsch, E. W., Ng, W. V. (2004) Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea, *Genome Research*, **14**, 2221–2234.
71. Oren, A., Ginzburg, M., Ginzburg, B. Z., Hochstein, L. I., Volcani, B. E. (1990) *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **40**, 209–210.
72. Pyatibratov, M. G., Beznosov, S. N., Rachel, R., Tiktopulo, E. I., Surin, A. K., Syutkin, A. S., Fedorov, O. V. (2008) Alternative flagellar filament

- types in the haloarchaeon *Haloarcula marismortui*, *Canadian Journal of Microbiology*, **54**, 835–844.
73. Matagne, A., Joris, B., Frere, J. M. (1991) Anomalous behaviour of a protein during SDS/PAGE corrected by chemical modification of carboxylic groups, *Biochemical Journal*, **280**, 553–556.
 74. Ikeda, J. S., Schmitt, C. K., Darnell, S. C., Watson, P. R., Bispham, J., Wallis, T. S., O'Brien, A. D. (2001) Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis, *Infection and Immunity*, **69**, 3021–3030.
 75. Syutkin, A. S., Pyatibratov, M. G., Galzitskaya, O. V., Rodriguez-Valera, F., Fedorov, O. V. (2014) *Haloarcula marismortui* archaeellin genes as eoparalogs, *Extremophiles*, **18**, 341–349.
 76. Сюткин А. С., Пятибратов М. Г., Безносков С. Н., Федоров О. В. (2012) Различные механизмы формирования спиральности галоархейных жгутиков, *Микробиология*, **81**, 620–629.
 77. Valliere-Douglass, J. F., Eakin, C. M., Wallace, A., Ketchum, R. R., Wang, W., Treuheit, M. J., Balland, A. (2010) Glutamine-linked and non-consensus asparagine-linked oligosaccharides present in human recombinant antibodies define novel protein glycosylation motifs, *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 16012–16022.
 78. Franzmann, P. D., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, J. K., Cameron, D. E., Stevenson, P. L., Burton, H. R. (1988) *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica, *Systematic and Applied Microbiology*, **11**, 20–27.
 79. Tu, D., Blaha, G., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2005) Gene replacement in *Haloarcula marismortui*: construction of a strain with two of its three chromosomal rRNA operons deleted, *Extremophiles*, **9**, 427–435.
 80. Lopez-Lopez, A., Benlloch, S., Bonfa, M., Rodriguez-Valera, F., Mira, A. (2007) Intragenomic 16S rDNA divergence in *Haloarcula marismortui* is an adaptation to different temperatures, *Journal of Molecular Evolution*, **65**, 687–696.
 81. Sanchez-Perez, G., Mira, A., Nyiro, G., Pasic, L., Rodriguez-Valera, F. (2008) Adapting to environmental changes using specialized paralogs, *Trends in Genetics*, **24**, 154–158.
 82. Bodaker, I., Sharon, I., Suzuki, M. T., Feingersh, R., Shmoish, M., Andreishcheva, E., Sogin, M. L., Rosenberg, M., Maguire, M. E., Belkin, S., Oren, A., Beja, O. (2010) Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment, *The ISME Journal*, **4**, 399–407.
 83. Williams, D., Gogarten, J.P., Papke, R.T. (2012) Quantifying homologous replacement of loci between haloarchaeal species, *Genome Biology and Evolution*, **4**, 1223–1244.
 84. Allers, T., Barak, S., Liddell, S., Wardell, K., Mevarech, M. (2010) Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*, *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 1759–1769.
 85. Deutscher, L., Renner, L.D., Cunitberti, G. (2014) Flagella – templates for the synthesis of metallic nanowires, *IFMBE Proceedings*, **41**, 860–863.