



УДК 577.352+579.222

ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА МЕМБРАНЫ *Exiguobacterium sibiricum* ПРИ ПОНИЖЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ: ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ

© 2025 г. Л. Е. Петровская*, **, #, Р. Х. Зиганшин*, Е. А. Крюкова*, Е. В. Спирина***, Е. М. Ривкина***, С. А. Силецкий****, *****, Д. А. Долгих*, *****, М. П. Кирпичников*, *****,

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Московский физико-технический институт, Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

*** ФГБУН “Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения” РАН, Россия, 142290 Пушкино, ул. Институтская, 2

**** Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/40

***** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Россия, 119192 Москва, ул. Колмогорова, 1/73

***** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119234 Москва, ул. Колмогорова, 1/12

Поступила в редакцию 14.05.2025 г.

После доработки 30.05.2025 г.

Принята к публикации 30.05.2025 г.

Впервые проведен анализ белков мембранной фракции психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* методом безметочной количественной хромато-масс-спектрометрии. При сравнении образцов из клеток, культивировавшихся при 10°C и при комнатной температуре, обнаружены существенные отличия в содержании многих белков, осуществляющих важнейшие физиологические процессы, включая ДНК- и РНК-связывающие белки, мембранные транспортеры, белки, обеспечивающие защиту от осмотического и окислительного стресса, и др. Результаты работы позволяют уточнить механизмы процессов, протекающих в мембранах клеток психротрофных бактерий при низких температурах, и дополняют существующие представления о стратегиях адаптации микроорганизмов, обитающих в многолетнемерзлых отложениях. Полученные данные также могут быть использованы для поиска потенциальных биокатализаторов, обладающих активностью при низких температурах.

Ключевые слова: *Exiguobacterium sibiricum*, многолетнемерзлые отложения, экстремофильные микроорганизмы, мембранные белки, протеом

DOI: 10.31857/S0132342325050219

ВВЕДЕНИЕ

Многолетнемерзлые отложения (ММО) Арктики представляют собой уникальную экологическую нишу, для которой характерны постоянно отрицательные температуры, низкая активность воды,

слабая доступность органических веществ и длительное воздействие радиации, источником которой выступают минералы вмещающей породы [1–3]. Показано, что ММО содержат значительное количество микроорганизмов, проявляющих метаболическую активность и сохраняющих жизне-

Сокращения: FC (fold change) – соотношение содержания белков в образцах; АФК – активные формы кислорода; ВЭЖХ-МС/МС – хромато-масс-спектрометрия; ЖК – жирные кислоты; МК – менахинон; ММО – многолетнемерзлые отложения; ПГ – пептидогликан.

Автор для связи: (эл. почта: lpetr65@yahoo.com).

способность после криоконсервации на протяжении геологического времени (до нескольких миллионов лет) [3–5].

Психротрофная грамположительная бактерия *Exiguobacterium sibiricum* (штамм 255-15), выделенная из ММО северо-востока Сибири, отличается способностью к росту в широком температурном диапазоне и сохраняет жизнеспособность после длительной криоконсервации [6]. В результате исследования генома, а также транскриптомного и протеомного анализа установлено наличие у этого микроорганизма различных механизмов адаптации к низкотемпературным условиям, которые включают изменение текучести мембран за счет повышения доли ненасыщенных жирных кислот в липидах, увеличение синтеза осмолитов и веществ с антиоксидантной активностью [7, 8]. Показано, что при экстремально низких и высоких температурах (–2.5 и +39°C) наблюдается значительное изменение профиля экспрессии генов, в то время как рост в температурном диапазоне 10–28°C происходит без существенных перестроек метаболизма. Ряд ферментов представлен несколькими вариантами, которые экспрессируются при различных температурах. При этом в аминокислотных последовательностях холодоактивных вариантов обнаружено наличие характерных особенностей, включая увеличенное число полярных остатков, снижение содержания остатков пролина и аргинина [7]. Некоторые белки *E. sibiricum* достаточно хорошо изучены, включая протеородопсин ESR [9, 10], олиго- α -1,6-гликозидазу [11] и другие ферменты, имеющие потенциальное значение для биотехнологического использования [12, 13].

Таким образом, в настоящее время накоплен достаточно большой объем информации, связанный с изменениями белкового профиля клеток *E. sibiricum* в ответ на понижение температуры. Однако комплексное исследование участия в этом процессе мембранных белков ранее не проводилось. Вместе с тем клеточная оболочка и мембрана играют важнейшую роль в адаптации бактерий к экстремальным условиям, поскольку обеспечивают основной контакт между микробной клеткой и внешней средой и регулируют потоки веществ и энергии между ними [14]. Известно, что для исследования мембранного протеома требуется использование специальных подходов, т.к. мембранные белки обычно более гидрофобны и, соответственно, менее представлены в результатах рутинного протеомного анализа [15].

Мы поставили цель исследовать изменения мембранного протеома клеток *E. sibiricum*, вызванные культивированием на бедной среде при

10°C. Эти условия приблизительно соответствуют наблюдаемым в сезонно-талом слое ММО в летний период, которые благоприятствуют росту и делению микроорганизмов [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Условия, существующие в низкотемпературной среде, и особенно при температуре ниже нуля, т.е. в ММО, характеризуются рядом факторов, затрудняющих выживание микроорганизмов. Наиболее очевидные из них – повышенная вязкость воды, низкая скорость химических реакций, снижение подвижности мембранных липидов и повышение стабильности вторичной структуры нуклеиновых кислот [16, 17]. Кроме того, важную роль играет увеличенная растворимость кислорода при низких температурах, которая приводит к повышению содержания его активных форм (АФК) в клетках [18, 19]. Таким образом, микроорганизмы в ММО испытывают комплексное стрессовое воздействие.

Между тем результаты транскриптомного анализа показали, что уровень экспрессии при 10°C по сравнению с 28°C отличается только у 3.2% генов *E. sibiricum* [7]. Однако образцы для этого анализа получали из культур, выращенных на 1/2 TSB (триптиказо-соевый бульон, разбавленный в 2 раза), в то время как представленные в нашей работе результаты получены для клеток, культивировавшихся на более бедной среде (стартовое разведение 1/40 TSB). Такие олиготрофные условия, по нашим данным, лучше соответствуют условиям обитания *E. sibiricum* и других микроорганизмов в сезонно-талом слое ММО.

В данной работе мы провели сравнительный анализ мембранных фракций клеток *E. sibiricum*, выращенных при 25 и 10°C, с помощью безметочной количественной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). В результате было идентифицировано 1604 полипептида, из которых для 104 белков было выявлено статистически достоверное отличие в содержании между сравниваемыми группами образцов.

Следует отметить, что на первом этапе работы мы анализировали образцы мембранных фракций без дополнительной промывки щелочным буфером, в результате чего был получен несколько меньший набор последовательностей (1064 полипептида). При этом в нем зафиксировано значительное количество цитоплазматических белков, которые, вероятно, были ассоциированы с мембранными белками и липидами. Результаты анализа мембранных фракций до промывки обнаружили многократное превышение содержания не-

которых белков в образце, выращенном при 10°C, включая белки холодового шока, ферменты и др. Например, установлено увеличенное содержание (FC) в клетках при 10°C по сравнению с клетками, культивировавшимися при 25°C, цитоплазматических компонентов фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной транспортной системы сахаров B1YJW8 (Exig_2154) в 322 раза, B1YKV5 (Exig_2306) в 300 раз. После промывки это соотношение значительно уменьшилось (FC 1.1 и 0.4 соответственно). Для белка семейства OsmC B1YJI5 (Exig_0534) FC до промывки составило 442, после – 0.6. Таким образом, наши данные подтверждают эффективность процедуры обработки образца карбонатным буфером с целью отмывки от избытка цитоплазматических белков, искажающих результаты анализа и затрудняющих идентификацию мембранных полипептидов [20].

В табл. 1 приведен список из 70 белков, содержание которых в образце мембранной фракции из клеток, культивировавшихся при 10°C, оказалось более чем в 2 раза выше, чем в образце, полученном в результате роста при 25°C (FC > 2.0). Примечательно, что не все белки в списке даже после отмывки классифицируются в базе данных UniProt как локализованные в клеточной мембране, среди них встречаются и предположительно цитоплазматические белки. Однако в большинстве случаев их присутствие можно объяснить

прочным взаимодействием с мембранными белками или липидами. Например, TrkA образует комплекс с мембранным транспортером калия TrkH [21], а фактор элонгации 4 (EF4) находится в связанном с мембраной состоянии и переходит в цитоплазму при понижении температуры или повышенной ионной силе [22]. Кроме того, некоторые секретируемые белки могут содержать гидрофобную сигнальную последовательность, которая в процессе транспорта связывает их с мембраной.

Ниже приведена классификация указанных в табл. 1 белков в соответствии с потенциальными клеточными функциями и предположительное объяснение их роли в адаптации *E. sibiricum* к условиям роста при пониженной температуре. Данная классификация, безусловно, приближительна, поскольку, во-первых, многие белки, в особенности регуляторные, обладают множественными активностями, и, во-вторых, в большинстве случаев она основывается исключительно на результатах сравнения аминокислотных последовательностей с последовательностями белков более изученных микроорганизмов. Детальное исследование изменений мембранного протеома *E. sibiricum* требует экспериментального подтверждения полученных данных.

Таблица 1. Белки *E. sibiricum*, содержание которых в образце мембранной фракции из клеток, культивировавшихся при 10°C, более чем в 2 раза превышает их содержание в образце, полученном в результате роста при 25°C

№	UniProt	KEGG	Функция	FC*	%**
Модификация ДНК и РНК					
1	B1YGY5	Exig_1590	ДНК-топоизомераза IV (ParC)	19.3	21.1
2	B1YK54	Exig_0654	A/G-специфическая аденингликозилаза	5.5	17.2
3	B1YQL6	Exig_0909	pРНК-метилтрансфераза	3.2	37.7
4	B1YHP4	Exig_1765	РНК-хеликаза	2.6	24.5
5	B1YIS9	Exig_1953	РНК-связывающий белок	2.2	7.4
Окислительный и осмотический стресс					
6	B1YER7	Exig_1196	Белок семейства OsmC	14.9	24.1
7	B1YHW0	Exig_0258	Медь-транслоцирующая АТФаза Р-типа	3.8	28.3
8	B1YJL4	Exig_0563	Алкилгидроксипероксидредуктаза (AhpC)	3.4	6.1
9	B1YKN6	Exig_0738	Фитоендесатураза	2.9	37.6
10	B1YMI9	Exig_2600	FAD-зависимая оксидоредуктаза	2.8	36.4
11	B1YKN4	Exig_0736	Фитоендесатураза	2.5	25.1
12	B1YHK4	Exig_1725	Внеклеточный белок, связывающий L-цистин	2.2	28.2
13	B1YJ87	Exig_2016	Белок с доменом TrkA	2.2	41.4

Таблица 1. (Продолжение)

№	UniProt	KEGG	Функция	FC*	%**
Мембранный гомеостаз					
14	B1YK27	Exig_0627	2-Сукцинил-5-енолпирувил-6-гидрокси-3-циклогексен-1-карбоксилатсинтаза (MenD)	13.3	25.0
15	B1YH87	Exig_0132	DD-карбоксипептидаза (VanY)	5.6	30.0
16	B1YEW3	Exig_1243	Трансгликозилаза	4.7	3.1
17	B1YH29	Exig_1635	Глицерофосфодиэфирфосфодиэстераза	3.3	22.2
18	B1YJN5	Exig_0584	Белок семейства DedA, содержащий VTT-домен	3.2	5.1
19	B1YM19	Exig_2527	Белок семейства DegV	2.7	21.0
20	B1YLA7	Exig_0859	Пенициллин-связывающий белок, транспептидаза	2.7	3.9
21	B1YJA3	Exig_2032	Белок семейства DegV	2.4	37.6
22	B1YML9	Exig_2631	Глицерофосфотрансфераза	2.2	11.5
23	B1YJS7	Exig_2113	MreD	2.0	10.8
24	B1YHI4	Exig_1704	Глицерофосфодиэфирфосфодиэстераза	2.0	52.7
25	B1YK24	Exig_0624	2-сукцинилбензоат-КоА лигаза (MenE)	2.0	31.1
Транспортеры					
26	B1YID6	Exig_0334	АВС-транспортер	4.8	15.0
27	B1YKV8	Exig_2309	Транспортер D-глюкозы, компонент PTS	3.3	6.9
28	B1YM85	Exig_0992	АВС-транспортер	3.1	13.2
29	B1YHW2	Exig_0260	Транспортер семейства EmrB	2.8	7.6
30	B1YM03	Exig_2511	Транспортер Mn ²⁺ /Fe ²⁺ семейства NRAMP	2.7	4.7
31	B1YE78	Exig_1101	АВС-транспортер	2.6	27.4
32	B1YEM7	Exig_2748	Транспортер Mg ²⁺ (MgtE)	2.2	3.1
Секреция					
33	B1YJT8	Exig_2124	Белок системы биосинтеза пилей (PilB)	4.4	45.5
34	B1YJT5	Exig_2121	Препилин (PilA)	4.0	26.2
35	B1YLH1	Exig_2426	SecA	3.5	55.4
36	B1YI84	Exig_1859	Белок системы биосинтеза флагелл (FlhF)	2.2	37.1
Ферменты					
37	B1YKS3	Exig_0775	GCN5-связанная N-ацетилтрансфераза (GNAT)	12.2	35
38	B1YKG3	Exig_2264	Пуллуланаза	11.0	15.2
39	B1YLC3	Exig_0875	Сульфатаза	6.0	1.6
40	B1YEW1	Exig_1241	Гликозидаза	4.7	9.0
41	B1YHF2	Exig_0198	Дигуанилатциклаза	3.5	4.4
42	B1YH30	Exig_1636	Металл-зависимая карбоксипептидаза	3.3	34.3
43	B1YJ34	Exig_0482	GCN5-связанная N-ацетилтрансфераза (GNAT)	3.3	26.8
44	B1YGB8	Exig_0007	Металл-зависимая фосфогидролаза	3.2	6.6
45	B1YFP0	Exig_2919	NAD-связывающая семиальдегиддегидрогеназа	3.0	60.7
46	B1YHC7	Exig_0173	Металлопротеаза	2.8	9.6
47	B1YL62	Exig_0813	Пуллуланаза	2.8	48.6
48	B1YKU7	Exig_2298	Гликозилтрансфераза	2.7	45.5
49	B1YG73	Exig_3012	Гликозидаза	2.6	21.4
50	B1YKP5	Exig_0747	ЕноилКоА-гидратаза/изомераза	2.5	8.6
51	B1YED4	Exig_1157	Дигуанилатциклаза/фосфодиэстераза	2.4	39.4
52	B1YKG9	Exig_2270	NAD-зависимая эписмераза/дегидратаза	2.4	63.8
53	B1YHJ0	Exig_1710	Сериновая аминопептидаза	2.3	15.6
54	B1YF42	Exig_2820	Эстераза/липаза	2.3	5.0
55	B1YKC9	Exig_2230	Амидогидролаза	2.1	41.4

Таблица 1. (Окончание)

№	UniProt	KEGG	Функция	FC*	%**
Стрессовый ответ					
56	B1YMB8	Exig_1025	Белок, индуцируемый повреждением компетентности (CinA)	6.3	15.7
57	B1YFI9	Exig_2868	Фактор транскрипции PucR	5.5	8.4
58	B1YJQ1	Exig_0600	Сенсорная гистидинкиназа	3.0	19.1
59	B1YLY0	Exig_0983	Белок, содержащий HPt-домен	2.7	16.9
60	B1YLY5	Exig_2493	Сенсорная гистидинкиназа	2.5	10.3
61	B1YKS7	Exig_0779	Репрессор транскрипции HgcA	2.2	44.9
62	B1YLR1	Exig_0914	Сигма 54-специфический регулятор транскрипции	2.1	52.3
63	B1YL73	Exig_0825	ГТФаза Ega	2.1	50.7
64	B1YKS5	Exig_0777	Фактор элонгации 4 (EF4)	2.1	27.7
Белки с неизвестными функциями					
65	B1YFJ1	Exig_2870	Белок, содержащий TRP-домен	5.7	20.2
66	B1YMK3	Exig_2614	Белок, содержащий DZANK-домен	3.7	28.6
67	B1YJ97	Exig_2026	Белок, содержащий HEAT-домен	3.6	29.5
68	B1YEA5	Exig_1128	Белок, содержащий Knp4/Smi1-подобный домен	3.2	29.3
69	B1YH25	Exig_1631	Белок, содержащий TRP-домен	2.7	6.2
70	B1YEP3	Exig_2764	Белок, содержащий HEAT-домен	2.3	10.5

Примечание: предполагаемые функции указаны в соответствии с классификацией баз данных UniProt и KEGG. Серым цветом отмечены белки, классифицированные как мембранные в базе данных UniProt.

* FC – соотношение содержания белков в образцах, полученных в результате культивирования при 10 и 25°C.

** % – степень покрытия белковой последовательности идентифицированными пептидами.

Свойства ДНК, транскрипция и трансляция.

Понижение температуры сопровождается изменением свойств ДНК, в частности наблюдается ее сверхспирализация [23]. Для эффективного участия ДНК в процессах репликации и транскрипции необходима релаксация сверхспирализованной структуры, которая происходит при помощи специализированных ферментов – топоизомераз. Субъединица ДНК-топоизомеразы IV (ParC) продемонстрировала максимальное (в 19.3 раза) повышение уровня синтеза в клетках *E. sibiricum* при 10°C. В присутствии ДНК белок ParC связан с мембраной, что объясняет его обнаружение в мембранной фракции [24].

Генерация АФК при низких температурах может приводить к повреждениям в структуре ДНК. Система эксцизионной репарации, которая устраняет из ДНК поврежденные основания, включает специфические ДНК-гликозилазы. Нами обнаружено повышение содержания А/Г-специфической аденингликозилазы (Exig_0654) в 5.5 раза при 10°C.

При понижении температуры увеличивается стабильность вторичной структуры РНК, что в большинстве случаев отрицательно сказывается

на процессах транскрипции и трансляции и лежит в основе стрессового ответа [25]. Повышение экспрессии РНК-хеликаз способствует разрушению таких структур [26, 27]. Установлено, что синтез потенциальных РНК-хеликаз был повышен у *E. sibiricum* при –2.5°C и 10°C [7]. В данном исследовании обнаружено увеличение содержания РНК-хеликазы Exig_1765 при 10°C в 2.6 раза.

Рибосомы – одни из основных мишеней стрессового ответа в бактериальных клетках [28]. Высококонсервативная ГТФаза Ega участвует в сборке рибосомы, образуя комплекс с ее малой субъединицей [29]. В клетках *Staphylococcus aureus* она взаимодействует с РНК-хеликазой и необходима для роста при низких температурах [30]. В нашем исследовании обнаружено увеличение содержания этого белка при 10°C в 2 раза. В ответ на стресс также нередко происходит модификация рРНК, например, при помощи метилирования [31]. Повышенное содержание РНК-связывающих и модифицирующих белков было зафиксировано в клетках *E. sibiricum* при 10°C, включая белок Exig_1953, участвующий в посттранскрипционной регуляции (в 2.2 раза), и рРНК-метилтрансферазу Exig_0909 (в 3.2 раза).

Фактор элонгации 4 (EF4), содержание которого у *E. sibiricum* при 10°C повышено в 2 раза, взаимодействует с замершими рибосомами и способствует продолжению синтеза белка в неблагоприятных условиях [22].

Изменения метаболизма. Содержание фермента MenD, который катализирует первую необратимую стадию синтеза менахинона (МХ), оказалось в 13.3 раза выше в мембране клеток, культивировавшихся при 10°C. МХ выполняет функцию переносчика электронов в дыхательной цепи грамположительных бактерий и необходим для клеточного метаболизма [32]. Для *Listeria monocytogenes* показано, что содержание МХ также способствует повышению подвижности мембранных липидов [33]. Таким образом, синтез МХ может выступать одним из механизмов холодовой адаптации микроорганизмов. Также обнаружено двукратное увеличение содержания фермента MenE (Exig_0624).

Ранее было показано, что в качестве источников энергии *E. sibiricum* преимущественно использует сахара и углеводы [6]. Геном этой бактерии включает многочисленные кодирующие последовательности гидролизующих их ферментов, имеющих различную специфичность и проявляющих активность в различных условиях [7]. Фосфоенолпируват-зависимая фосфотрансферазная система (ФТС) – наиболее распространенная система транспорта углеводов у бактерий [34]. Увеличение содержания мРНК компонентов ФТС транспорта глюкозы *E. sibiricum* при низких температурах описано в работе [7]. В нашем исследовании обнаружено повышенное в 3.26 раз содержание мембранного ПВС-компонента данной системы при 10°C. Также обращает на себя внимание почти 11-кратное увеличение при 10°C уровня синтеза пуллулазы – фермента, гидролизующего пуллулан в составе крахмала (Exig_2264). Содержание другой предполагаемой пуллулазы Exig_0813 было повышено в 2.8 раз. Почти в 6 раз увеличено содержание сульфатазы Exig_0875. Совместное действие сульфатаз с ферментами, гидролизующими углеводы, приводит к образованию нейтральных олигосахаридов, служащих источником энергии [35]. Предположительно, повышая уровень синтеза ферментов, адаптированных к низким температурам, *E. sibiricum* оптимизирует удовлетворение своих энергетических потребностей.

Регуляция стрессового ответа. У большинства бактерий в стрессовом ответе участвуют двухкомпонентные системы, включающие мембранную сенсорную киназу и взаимодействующий с ней регуляторный белок, который активирует экспрессию специфических генов [36]. Мы обнаружили увеличение содержания соответствующих мембранных компонентов таких систем (Exig_0600 и Exig_2493) в клетках *E. sibiricum* при 10°C в 3 и 2.5 раза соответственно. Первый из этих белков гомологичен сенсорной киназе LiaS *B. subtilis*, его ген – часть оперона *lia* (Exig_0559-0603); второй – гомолог сенсорной киназы VseS, кодируется в одном опероне с ABC-транспортёрами [37]. Обе эти системы реагируют на нарушения мембранного гомеостаза, включая воздействие антибиотиков, органических растворителей, изменение pH и другие факторы. Установлено, что у *Streptococcus mutans* система Lia регулирует экспрессию генов, продукты которых участвуют в биосинтезе пептидогликана (ПГ) и мембранных белков в ответ на повреждение клеточной стенки различными факторами [38]. Некоторые подобные системы включают дополнительный компонент – белок, содержащий гистидин-фосфотрансферный домен (HPt) [39]. Для одного из таких белков (Exig_0983) также обнаружено увеличение в 2.7 раза содержания в клетках, культивировавшихся при пониженной температуре.

Состояние компетентности вырабатывается в бактериях в ответ на стрессовые воздействия и тесно связано с системой репарации и рекомбинации (SOS) [40]. Ключевую роль в этих процессах играют продукты экспрессии оперона *cinA-recA* [41]. Содержание белка, индуцируемого повреждением компетентности (CinA), в клетках *E. sibiricum* при 10°C увеличилось в 6.3 раза. Продукт гена *hrcA* служит отрицательным регулятором экспрессии генов теплового шока, которые находятся с ним в одном опероне [42]. Увеличение содержания HrcA в 2.24 раза может быть связано с пониженным синтезом в клетках *E. sibiricum* шаперонов DnaK, DnaJ и GrpE при низких температурах.

Секреция и транспортеры. Процессы секреции играют важную роль в выживании бактериальных клеток, поскольку в условиях стресса увеличивается потребность в белках стрессового ответа, многие из которых мембранные или мембраносвязанные [31]. Большинство секретируемых

белков преодолевает клеточную мембрану при участии Sec-транслокационного комплекса. Согласно полученным нами данным, при понижении температуры в клетках *E. sibiricum* происходит существенное (в 3.5 раза) увеличение содержания молекулярного мотора SecA, который за счет энергии АТФ осуществляет перемещение полипептидных цепей через канал транслокации, комплекс SecYEG [43].

При 10°C *E. sibiricum* сохраняет способность формировать внеклеточные структуры – пили и флагеллы, которые отсутствуют при понижении температуры до –2.5°C [7]. В данной работе мы обнаружили значительное повышение содержания белков PilB и PilA (в 4.4 и 4.0 раза соответственно), которые предположительно выполняют функции АТФазы, катализирующей формирование субъединиц пилей, и основного пилина. Их биосинтез и сборка определяются набором белков, гены которых относятся к оперону *pil* [44]. Подобные пили могут использоваться бактериями для перемещения в условиях повышенной вязкости среды, как было показано для *Pseudomonas aeruginosa* [45]. Также оказалось увеличенным в 2.2 раза содержание предполагаемого компонента системы биосинтеза флагелл – ГТФ-связывающего белка FlhF [46].

В ответ на изменение условий окружающей среды клетки бактерий регулируют синтез белков, которые осуществляют транспорт молекул, необходимых для поддержания гомеостаза. Так, при ограничении ресурсов наблюдается повышение экспрессии мембранных систем транспорта питательных веществ, а в условиях увеличенной осмолярности – веществ, обладающих осмопротекторными свойствами [47]. Подобные функции часто выполняют АВС-транспортеры, высококонсервативные мембранные АТФ-зависимые транспортные белки [48]. В мембранной фракции клеток, культивировавшихся при 10°C, обнаружено существенное повышение содержания некоторых АВС-транспортеров, в частности Exig_3334 (в 4.8 раза), Exig_0992 (в 3.1 раза), Exig_1101 (в 2.6 раза), Exig_1100 и Exig_0710 (в 2 раза). Предполагается, что увеличенное количество мембранных транспортных белков – характерная черта *Exiguobacteria*, позволившая представителям этого рода адаптироваться к разнообразным экологическим нишам [49].

Также при понижении температуры в клетках *E. sibiricum* отмечается увеличение в 2.7 раза содержания белков семейства NRAMP, которое включает рН-зависимые транспортеры дивалентных катионов (прежде всего Mn^{2+} и Fe^{2+}), участвующих в ответе на синтез АФК [50], и транспортера магния MgtE (в 2.2 раза).

Белок TrkA отвечает за импорт калия в ответ на осмотический шок и поддержание мембранного потенциала [51]. Его содержание в клетках *E. sibiricum* при 10°C повышено в 2.2 раза. Содержание транспортера калия TrkH (Exig_2878) также повышено, однако менее значительно (в 1.4 раза). Калий играет осмопротекторную роль у бактерий, его концентрация в клетках может достигать 1 М в условиях осмотического стресса [51]. Можно предположить, что в ответ на осмотический стресс, возникающий при низких температурах, *E. sibiricum* увеличивает концентрацию ионов калия в цитозоле при участии Trk-системы. Повышенное содержание транспортера магния MgtE может быть связано с необходимостью обратного переноса в клетки ионов магния, концентрация которых снижается при повышении концентрации калия в цитоплазме [52].

Ответ на окислительный стресс. Вследствие повышенной растворимости кислорода и увеличенной генерации его активных форм (АФК) при низких температурах в клетках бактерий развивается окислительный стресс, связанный с повреждением структуры макромолекул (нуклеиновых кислот, белков и липидов). Клеточный ответ на него включает синтез различных ферментов и антиоксидантов [18]. В данном исследовании обнаружено повышенное содержание ряда белков, предположительно связанных с ответом клеток *E. sibiricum*, культивировавшихся при 10°C, на окислительный стресс. В частности, обнаружено увеличение в 14.9 раз уровня синтеза белка OsmC, который участвует в защите от окислительного стресса, вызванного органическими гидроперекисями [53]. Показано, что синтез OsmC в клетках микобактерий возрастает в ответ на понижение температуры [54]. Синтез алкилгидроксипероксидредуктазы (AhpC), другого фермента с подобными функциями, был увеличен в 3.4 раза. Повышенный синтез этого белка был обнаружен при низких температурах в клетках молочнокислых бактерий [55].

Другие белки, предположительно связанные с реакцией на окислительный стресс, также демонстрируют повышенное содержание при 10°C, например, медь-транслоцирующая АТФаза Р-типа (в 3.8 раза), FAD-зависимая оксидоредуктаза (в 2.8 раза), связывающий L-цистин внеклеточный белок (Exig_1725), содержание которого в клетках при 10°C было повышено в 2.2 раза. Увеличенный синтез фитондесатураз Exig_0735, Exig_0736 и Exig_0738 (в 1.8, 2.5 и 2.9 раз соответственно) в этих условиях может опосредовать повышение содержания в клетках каротиноидов, обеспечивающих антиоксидантную защиту [56].

Изменение свойств мембраны и клеточной стенки. Известно, что понижение температуры сопровождается значительными модификациями липидного и белкового состава мембран психрофильных микроорганизмов [57]. У грамположительных бактерий эти модификации включают изменение свойств как мембраны, так и клеточной стенки, состоящей из ПГ и тейхоевых кислот. Увеличение уровня экспрессии генов, ответственных за синтез ПГ (опероны *mur* и *dap*), ранее было отмечено у *E. sibiricum* только при понижении температуры до -2.5°C [7]. В соответствии с этими данными мы не выявили существенного изменения уровня синтеза соответствующих ферментов при 10°C, однако обнаружили повышенное содержание некоторых белков, обеспечивающих модификацию структуры ПГ. Так, можно отметить повышение в 2.7 раза содержания пенициллин-связывающего белка (транспептидазы Exig_0859), который предположительно участвует в образовании кросс-сшивок между цепями ПГ [58]. Литические трансгликозилазы (Exig_1243, FC 4.7) катализируют перестройку ПГ, создавая в нем временные поры, необходимые для деления клеток, сборки систем секреции, флагелл и т.п. [59].

Ряд белков, содержание которых в клетках *E. sibiricum* оказалось увеличено при 10°C, потенциально участвуют в регуляции процессов синтеза и модификации компонентов клеточной стенки бактерий. Гомолог MreD Exig_2113 (FC 2.0) выполняет регуляторную функцию в синтезе ПГ [60], а металлопептидазы могут быть задействованы в рециркуляции его компонентов [61]. Глицерофосфотрансфераза (Exig_2631, FC 2.2) – гомолог белка TagF *B. subtilis*, принимающий участие в синтезе тейхоевых кислот [62].

Повышенный синтез десатураз, обеспечивающий жидкое состояние мембран при низких температурах, – распространенная адаптация психрофильных микроорганизмов [16]. Переход к преимущественному использованию ненасыщенных жирных кислот (ЖК) происходит у *E. sibiricum* при 4°C, хотя увеличение экспрессии генов десатураз наблюдается также при 10°C [7]. В данной работе обнаружено небольшое (в 1.3 раза) увеличение содержания десатуразы Exig_2392 при 10°C. Более значительное повышение содержания в клетках зафиксировано для некоторых белков, участвующих в синтезе и обмене ЖК, например, еноилКоА-гидратазы/изомеразы, фермента пути β -окисления ЖК (Exig_0747, FC 2.5). Дополнительная (изомеразная) функция, присущая одному и тому же ферменту, может быть важна в оптимизации метаболизма ненасыщенных ЖК при низких температурах, что коррелирует с повышением их важности и содержания в мембранных липидах в этих условиях. Продукты пути деградации ЖК могут использоваться бактериями при низких температурах в качестве альтернативного источника энергии, что также объясняет повышенный синтез соответствующих ферментов [63].

Содержание белков семейства DegV (Exig_2527 и Exig_2032), связывающих ЖК с высокой аффинностью [64], оказалось повышено в 2.7 и 2.4 раза соответственно. Некоторые другие ферменты также могут участвовать в биосинтезе компонентов мембраны и клеточной стенки, например, GCN5-связанная *N*-ацетилтрансфераза (Exig_0482, FC 3.3), NAD-зависимая эпимераза/дегидратаза (Exig_2270, FC 2.4), глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразы Exig_1635 и Exig_1704 (FC 3.3 и 2.0 соответственно).

Выше нами отмечалось увеличение синтеза ферментов пути биосинтеза каротиноидов у *E. sibiricum* при понижении температуры. Многие психрофильные микроорганизмы продуцируют каротиноиды, взаимодействующие с клеточной мембраной и влияющие на ее свойства [56]. При этом влияние на жесткость мембраны зависит от типа каротиноида – полярные способствуют ее увеличению, а неполярные – наоборот [65]. В данный момент неизвестно, какие именно каротиноиды синтезируются клетками *E. sibiricum* при 10°C, однако на основании реконструкции метаболических путей и литературных данных, полученных для родственных видов, можно предположить наличие в них неполярного β -каротина, который может повышать текучесть мембраны при низких температурах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм Bio-Rad (США), Merck (США) и Panreac (Испания), компоненты сред для культивирования бактерий (Difco, США), органические растворители производства Химмед (Россия). Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ. Штамм *E. sibiricum* 255-15 предоставлен к.б.н. Т.А. Вишневской (ИФХиБПП РАН).

Культивирование клеток *E. sibiricum*. Клетки штамма *E. sibiricum* 255-15 хранили при -70°C в питательной среде $\frac{1}{2}$ TSB (триптиказо-соевый бульон, разбавленный в 2 раза) с добавлением глицерина до 20%. Замороженные клетки восстанавливали на твердой питательной среде $\frac{1}{2}$ TSA (триптиказо-соевый агар, $\frac{1}{2}$ TSB с добавлением 1.5% агара) при 30°C . Выросшие колонии переносили в пробирки объемом 50 мл (Corning, США), содержащие 10 мл питательной среды $\frac{1}{2}$ TSB, и инкубировали при 30°C в течение 16 ч до $\text{ОП}_{600} \sim 4$. Полученный инокулят вносили в качалочные колбы объемом 1 л, содержащие 200 мл стерильной водопроводной H_2O , в соотношении 1 : 20. Культивирование проводили в условиях принудительной аэрации (200 об/мин) на шейкере Innova (Brunswick, США) при 10 или 25°C .

Выделение мембранной фракции. Клетки осаждали при 7000g в течение 10 мин при 5°C , после чего осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 20%-ную сахарозу, лизоцим (0.4 мг/мл), выдерживали в течение 1 ч и разрушали обработкой ультразвуком. Суспензию центрифугировали 30 мин при 6000g, 5°C . Полученный супернатант центрифугировали 1 ч при 100 000g, 5°C и ресуспендировали осадок мембранной фракции в 50 mM Tris-HCl, pH 8.0.

Для удаления примесей цитоплазматических белков к 100 мкл суспензии добавляли 300 мкл охлажденного раствора 100 mM Na_2CO_3 , инкубировали в течение 1 ч при перемешивании на ледяной бане, после чего повторяли центрифугирование при 100 000g, 5°C . Осадок ресуспендировали в 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, и использовали для последующего протеомного анализа.

Гидролиз белков трипсином в растворе. Аликвоту суспензии, содержащую 20 мкг белка, высушивали досуха на центрифужном вакуумном

концентраторе SpeedVac (Savant, Франция) и растворяли в 20 мкл буферного раствора, содержащего 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1% дезоксихолата натрия, 10 mM ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфин)) и 20 mM 2-СAA (2-хлороацетамид), прогревали в течение 10 мин при 85°C и охлаждали до комнатной температуры. К раствору белка добавляли 0.4 мкг трипсина в 10 мкл 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, и инкубировали при 37°C в течение ночи. По окончании инкубации к реакционной смеси добавляли равный объем 2%-ной ТФУ и обессоливали пептиды на самодельной микроколонке SDB-RPS StageTip [66]. Раствор пептидов наносили на микроколонку центрифугированием при 300g, промывали 2 раза смесью растворителей 50 мкл 1%-ной ТФУ: 50 мкл этилацетата, 50 мкл 0.2%-ной ТФУ и элюировали 60 мкл раствора, содержащего 5% гидроксида аммония и 60% ацетонитрила в воде. Элюат высушивали и хранили при -80°C . Перед анализом пептиды растворяли в 40 мкл раствора, содержащего 0.1% ТФУ и 2% ацетонитрила в воде.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Образцы загружали на изготовленную в лаборатории предколонку 50×0.1 мм, упакованную сорбентом Reprosil-Pur 200 C18-AQ 5 мкм (Dr. Maisch, Германия), в растворе, содержащем 2% ацетонитрила, 97.9% H_2O , 0.1% ТФУ, при скорости потока 4.2 мкл/мин и разделяли при комнатной температуре на колонке из плавленого кварца 300×0.1 мм с эмиттером, изготовленной на приборе P2000 Laser Puller (Sutter, США) и упакованной в лаборатории сорбентом Reprosil PUR C18AQ 1.9 (Dr. Maisch). Обращенно-фазовую хроматографию проводили на хроматографе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), соединенным с масс-спектрометром Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific). Для хроматографического разделения пептидов использовали систему растворителей А (99.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты) и Б (19.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты, 80% ацетонитрила). Пептиды элюировали с колонки линейным градиентом: 3% Б в течение 3 мин, 3–6% Б за 2 мин, 6–32% Б за 100 мин, 32–50% Б за 18 мин, 50–99% Б за 0.1 мин, 99% Б в течение 3 мин, 99–3% Б за 0.1 мин, при скорости потока 500 нл/мин.

Анализ масс-спектрометрических данных проводили с помощью компьютерных программ MaxQuant 2.4.2.0 (<https://www.maxquant.org/>) [67] и Perseus 2.0.10.0 (<https://maxquant.net/perseus/>) [68]. Для корреляции тандемных масс-спектров с аминокислотными последовательностями белков использовали базу данных белковых последовательностей UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (версия от 06.2023). Для выявления белков, статистически достоверно отличающихся по содержанию между двумя сравниваемыми группами образцов, использовали двухвыборочный *t*-тест ($p < 0.05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Холодные местообитания, включая многолетнемерзлые отложения Арктики, составляют значительную часть территории России и имеют важнейшее значение для развития экономики страны. Изучение микробных сообществ этих экологических ниш позволяет оценить их вклад в глобальные геохимические процессы, а также возможный ответ на климатические изменения. В данной работе впервые исследован протеомный ответ клеточной мембраны психротрофной бактерии *E. sibiricum* на понижение температуры до 10°C. По сравнению с клетками, культивировавшимися при комнатной температуре, обнаружены существенные изменения содержания многих белков, осуществляющих важнейшие физиологические процессы, включая ДНК- и РНК-связывающие белки, мембранные транспортеры, белки, обеспечивающие защиту от осмотического и окислительного стресса, и др. Результаты работы позволяют уточнить механизмы процессов, протекающих в мембранах бактериальных клеток при низких температурах, и дополняют существующие представления о стратегиях адаптации микроорганизмов, обитающих в многолетнемерзлых отложениях. Полученные данные также могут быть использованы для поиска потенциальных биокатализаторов, обладающих активностью при низких температурах.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00160) (протеомный анализ) и в рамках государственного задания № 12204500038-3 “Многолетнемерзлые отложения и мерзлотные почвы: температурный режим,

биота, биогеохимические процессы, и перспективы функционирования экосистем при глобальном потеплении климата” (получение бактериальных культур).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

ЛЕП, ЕМР, ДАД, МПК – концепция и руководство работой; ЕВС, ЕАК, РХЗ, ЛЕП – проведение экспериментов; ЛЕП, РХЗ, САС, ЕМР – анализ данных; ЛЕП, ЕВС, ЕМР – написание статьи.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tarnocai C. // In: *Permafrost Soils* / Ed. Margesin R. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. P. 3–16. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69371-0_1
2. Gilichinsky D.A., Rivkina E.M. // In: *Encyclopedia of Geobiology*. Encyclopedia of Earth Sciences Series / Eds. Reitner J., Thiel V. Dordrecht: Springer, 2011. P. 726–732. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1_162
3. Jansson J.K., Tas N. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2014. V. 12. P. 414–425. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3262>
4. Rivkina E., Laurinavichius K., McGrath J., Tiedje J., Shcherbakova V., Gilichinsky D. // *Adv. Space Res.* 2004. V. 33. P. 1215–1221. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2003.06.024>
5. Vishnivetskaya T.A., Petrova M.A., Urbance J., Ponder M., Moyer C.L., Gilichinsky D.A., Tiedje J.M. // *Astrobiology*. 2006. V. 6. P. 400–414. <https://doi.org/10.1089/ast.2006.6.400>
6. Rodrigues D.F., Goris J., Vishnivetskaya T., Gilichinsky D., Thomashow M.F., Tiedje J.M. // *Extremophiles*. 2006. V. 10. P. 285–294. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0497-5>

7. *Rodrigues D.F., Ivanova N., He Z., Huebner M., Zhou J., Tiedje J.M.* // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 547.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-547>
8. *Qiu Y., Vishnivetskaya T.A., Lubman D.M.* // In: *Permafrost Soils* / Ed. Margesin R. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. P. 169–181.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-69371-0_12
9. *Petrovskaya L.E., Siletsky S.A., Mamedov M.D., Lukashev E.P., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* // Biochemistry (Moscow). 2023. V. 88. P. 1544–1554.
<https://doi.org/10.1134/s0006297923100103>
10. *Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A., Erokhina L.G., Gilichinsky D.A., Shuvalov V.A., Kirpichnikov M.P.* // FEBS Lett. 2010. V. 584. P. 4193–4196.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.005>
11. *Berlina Y.Y., Petrovskaya L.E., Kryukova E.A., Shingarova L.N., Gapizov S.S., Kryukova M.V., Rivkina E.M., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A.* // Biomolecules. 2021. V. 11. P. 1229.
<https://doi.org/10.3390/biom11081229>
12. *Gangoiti J., Pijning T., Dijkhuizen L.* // Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82. P. 756–766.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03420-15>
13. *Löwe J., Ingram A.A., Gröger H.* // Bioorg. Med. Chem. 2018. V. 26. P. 1387–1392.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.005>
14. *Konings W.N., Albers S.-V., Koning S., Driesen A.J.M.* // Antonie Van Leeuwenhoek. 2002. V. 81. P. 61–72.
<https://doi.org/10.1023/A:1020573408652>
15. *Soufi B., Macek B.* // Int. J. Med. Microbiol. 2015. V. 305. P. 203–208.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.12.017>
16. *Rodrigues D.F., Tiedje J.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 1677–1686.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02000-07>
17. *Collins T., Margesin R.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. P. 2857–2871.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09659-5>
18. *Seixas A.F., Quendera A.P., Sousa J.P., Silva A.F.Q., Arraiano C.M., Andrade J.M.* // Front. Genet. 2022. V. 12. P. 821535.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.821535>
19. *Ezraty B., Gennaris A., Barras F., Collet J.-F.* // Nat. Rev. Microbiol. 2017. V. 15. P. 385–396.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>
20. *Molloy M.P., Herbert B.R., Slade M.B., Rabilloud T., Nouwens A.S., Williams K.L., Gooley A.A.* // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 2871–2881.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01296.x>
21. *Cao Y., Pan Y., Huang H., Jin X., Levin E.J., Kloss B., Zhou M.* // Nature. 2013. V. 496. P. 317–322.
<https://doi.org/10.1038/nature12056>
22. *Pech M., Karim Z., Yamamoto H., Kitakawa M., Qin Y., Nierhaus K.H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 3199–3203.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1012994108>
23. *Weber M.H.W., Marahiel M.A.* // Sci. Prog. 2003. V. 86. P. 9–75.
<https://doi.org/10.3184/003685003783238707>
24. *Kato J., Suzuki H., Ikeda H.* // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 25676–25684.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)35660-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35660-6)
25. *Zhang Y., Burkhardt D.H., Rouskin S., Li G.-W., Weissman J.S., Gross C.A.* // Mol. Cell. 2018. V. 70. P. 274–286.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.035>
26. *Owtrim G.W.* // RNA Biol. 2013. V. 10. P. 96–110.
<https://doi.org/10.4161/rna.22638>
27. *Pavankumar T.L., Rai N., Pandey P.K., Vincent N.* // DNA. 2024. V. 4. P. 455–472.
<https://doi.org/10.3390/dna4040031>
28. *Starosta A.L., Lassak J., Jung K., Wilson D.N.* // FEMS Microbiol. Rev. 2014. V. 38. P. 1172–1201.
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12083>
29. *Gruffaz C., Smirnov A.* // Front. Mol. Biosci. 2023. V. 10. P. 1263433.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1263433>
30. *Wood A., Irving S.E., Bennison D.J., Corrigan R.M.* // PLoS Genet. 2019. V. 15. P. e1008346.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008346>
31. *Njenga R., Boele J., Öztürk Y., Koch H.-G.* // J. Biol. Chem. 2023. V. 299. P. 105163.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105163>
32. *Hederstedt L.* // Biochemistry (Moscow). 2021. V. 86. P. 8–21.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921010028>
33. *Seel W., Flegler A., Zunabovic-Pichler M., Lipski A.* // J. Bacteriol. 2018. V. 200. P. e00148-18.
<https://doi.org/10.1128/jb.00148-18>
34. *Jeckelmann J.-M., Erni B.* // In: *Bacterial Cell Walls Membranes* / Ed. Kuhn A. Cham: Springer Int. Publ., 2019. P. 223–274.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_8
35. *Trincon A.* // Molecules. 2018. V. 23. P. 901.
<https://doi.org/10.3390/molecules23040901>
36. *Mascher T.* // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 264. P. 133–144.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00444.x>

37. George N.L., Orlando B.J. // Nat. Commun. 2023. V. 14. P. 3896.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-39678-w>
38. Suntharalingam P., Senadheera M.D., Mair R.W., Lévesque C.M., Cvitkovitch D.G. // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 2973–2984.
<https://doi.org/10.1128/jb.01563-08>
39. Hsu J.-L., Chen H.-C., Peng H.-L., Chang H.-Y. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 9933–9944.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M708836200>
40. Claverys J.-P., Prudhomme M., Martin B. // Annu. Rev. Microbiol. 2006. V. 60. P. 451–475.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142139>
41. Erill I., Campoy S., Barbé J. // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. P. 637–656.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00082.x>
42. Schulz A., Schumann W. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 1088–1093.
<https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1088-1093.1996>
43. Prabudiansyah I., Driessen A.J.M. // In: Protein Sugar Export Assembly Gram-positives / Eds. Bagnoli F., Rappuoli R. Cham: Springer Int. Publ., 2017. P. 45–67.
https://doi.org/10.1007/82_2016_9
44. Imam S., Chen Z., Roos D.S., Pohlschröder M. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e28919.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028919>
45. Jin F., Conrad J.C., Gibiansky M.L., Wong G.C.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 12617–12622.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1105073108>
46. Schuhmacher J.S., Thormann K.M., Bange G. // FEMS Microbiol. Rev. 2015. V. 39. P. 812–822.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuv034>
47. Herrou J., Willett J.W., Czyż D.M., Babnigg G., Kim Y., Crosson S. // J. Bacteriol. 2017. V. 199. P. e00746-16.
<https://doi.org/10.1128/jb.00746-16>
48. Rismondo J., Schulz L.M. // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 163.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9010163>
49. Zhang D., Zhu Z., Li Y., Li X., Guan Z., Zheng J. // mSystems. 2021. V. 6. P. e0038321.
<https://doi.org/10.1128/msystems.00383-21>
50. Shabayek S., Bauer R., Mauerer S., Mizaikoff B., Spellerberg B. // Mol. Microbiol. 2016. V. 100. P. 589–606.
<https://doi.org/10.1111/mmi.13335>
51. Sleator R.D., Hill C. // FEMS Microbiol. Rev. 2002. V. 26. P. 49–71.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00598.x>
52. Wendel B.M., Pi H., Krüger L., Herzberg C., Stülke J., Helmann J.D. // mBio. 2022. V. 13. P. e00092-22.
<https://doi.org/10.1128/mbio.00092-22>
53. Lesniak J., Barton W.A., Nikolov D.B. // Protein Sci. 2003. V. 12. P. 2838–2843.
<https://doi.org/10.1110/ps.03375603>
54. Saikolappan S., Das K., Sasindran S.J., Jagannath C., Dhandayuthapani S. // Tuberculosis. 2011. V. 91. P. S119–S127.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.10.021>
55. Goto S., Kawamoto J., Sato S.B., Iki T., Watanabe I., Kudo K., Esaki N., Kurihara T. // AMB Expr. 2015. V. 5. P. 11.
<https://doi.org/10.1186/s13568-015-0098-3>
56. Sajjad W., Din G., Rafiq M., Iqbal A., Khan S., Zada S., Ali B., Kang S. // Extremophiles. 2020. V. 24. P. 447–473.
<https://doi.org/10.1007/s00792-020-01180-2>
57. Tribelli P.M., López N.I. // Life. 2018. V. 8. P. 8.
<https://doi.org/10.3390/life8010008>
58. Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J.A., Charlier P. // FEMS Microbiol. Rev. 2008. V. 32. P. 234–258.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
59. Martinez-Bond E.A., Soriano B.M., Williams A.H. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2022. V. 77. P. 102480.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102480>
60. Shih Y.-L., Rothfield L. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006. V. 70. P. 729–754.
<https://doi.org/10.1128/mmbr.00017-06>
61. Meziane-Cherif D., Stogios P.J., Evdokimova E., Savchenko A., Courvalin P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 5872–5877.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1402259111>
62. Brown S., Santa Maria J.P., Walker S. // Annu. Rev. Microbiol. 2013. V. 67. P. 313–336.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620>
63. Ting L., Williams T.J., Cowley M.J., Lauro F.M., Guilhaus M., Raftery M.J., Cavicchioli R. // Environ. Microbiol. 2010. V. 12. P. 2658–2676.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02235.x>
64. Lambert C., Poullion T., Zhang Q., Schmitt A., Masse J.-M., Gloux K., Poyart C., Fouet A. // PLoS One. 2023. V. 18. P. e0284402.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284402>
65. Gabrielska J., Gruszecki W.I. // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1996. V. 1285. P. 167–174.
[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(96\)00152-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(96)00152-6)
66. Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. // Nat. Protoc. 2007. V. 2. P. 1896–1906.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.261>
67. Tyanova S., Temu T., Cox J. // Nat. Protoc. 2016. V. 11. P. 2301–2319.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>
68. Tyanova S., Temu T., Sinitcyn P., Carlson A., Hein M.Y., Geiger T., Mann M., Cox J. // Nat. Methods. 2016. V. 13. P. 731–740.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>

Changes in the Protein Composition of the *Exiguobacterium sibiricum* Membrane with Decreasing Temperature: a Proteomic Analysis

L. E. Petrovskaya *, **, #, R. H. Ziganshin*, E. A. Kryukova*, E. V. Spirina***, E. M. Rivkina***,
S. A. Siletsky****, *****, D. A. Dolgikh*, *****, and M. P. Kirpichnikov*, *****

E-mail: lpetr65@yahoo.com

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Moscow Institute of Physics and Technology, ul. Institutsky per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

*** Institute of Physical, Chemical and Biological Problems of Soil Science, RAS,
ul. Institutskaya 2, Pushchino, 142290 Russia

**** Research Institute of Physical and Chemical Biology named after A.N. Belozersky,
Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye Gory 1/40, Moscow, 119234 Russia

***** Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,
ul. Kolmogorova 1/73, Moscow, 119192 Russia

***** Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
ul. Kolmogorova 1/12, Moscow, 119234 Russia

For the first time, the proteins of the membrane fraction isolated from the psychrotrophic bacterium *Exiguobacterium sibiricum* were analyzed using the label-free quantitative chromatography-mass spectrometry. Comparison of the samples from cells cultured at 10°C and at room temperature revealed significant differences in the content of many proteins involved in important physiological processes, including DNA and RNA binding proteins, membrane transporters, proteins providing protection against osmotic and oxidative stress, and others. The results of the work contribute to understanding of mechanisms of the processes occurring in the cell membranes of psychrotrophic bacteria at low temperatures, and complement existing ideas about the adaptation strategies of microorganisms living in permafrost deposits. The data obtained can also be used to search for potential biocatalysts with activity at low temperatures.

Keywords: *Exiguobacterium sibiricum*, permafrost deposits, extremophilic microorganisms, membrane proteins, proteome