

## ОБЗОРЫ

© Коллектив авторов, 2020



# Значение мембранных фосфолипидов в реализации защитных стратегий бактерий

Андрюков Б.Г.<sup>✉</sup>, Ляпун И.Н., Матосова Е.В.

ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», 690087, Владивосток, Россия

Для сохранения жизнеспособности в стрессовых условиях существования и реализации защитных стратегий бактерии должны воспринимать сигналы и быстро реагировать на экстремальные изменения параметров среды обитания. Результаты недавних экспериментальных исследований дополнили доминировавшую с 1970-х гг. парадигму о преимущественной роли фосфолипидов (ФЛ) как молекулярных строительных блоков для формирования клеточной стенки бактерий. Установлено, что специфические трансформации этих липидных доменов оказывают существенное влияние на форму и функционирование клеток, ремоделирование мембран и способность бактерий адаптироваться к стрессам окружающей среды. Физиологическая роль бактериальных фосфолипидов является плейотропной и определяет целостность и функцию клеток. Помимо ключевой структурной роли мембранных ФЛ в клетке, их промежуточные метаболиты способны выступать в качестве вторичных мессенджеров и играть важные сигнальные и регуляторные роли. Выявлено, что гомеостаз ФЛ имеет решающее значение для патогенеза бактериальных инфекций и необходим не только для поддержания жизнеспособности бактерий, но и для обеспечения их роста в период инфекции, а нарушение биосинтеза этих макромолекул снижает жизнеспособность бактерий. В последние десятилетия одним из главных достижений в концепции модели биологических мембран на основе «жидкой мозаики» стало понимание их доменной структуры. Это открытие представляет фундаментальный и практический интерес, поскольку фосфолипидные домены являются перспективной мишенью современных антимикробных стратегий. Цель настоящего обзора — обобщение современных представлений о структурной, метаболической и сигнальной роли мембранных ФЛ в реализации защитных механизмов бактерий и поддержании их жизнеспособности в неблагоприятных условиях среды обитания.

**Ключевые слова:** бактериальные фосфолипиды; клеточная стенка; клеточные мембраны; ремоделирование; стрессовая адаптация; стрессовые реакции.

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках государственного задания по теме НИР № 0545-2019-0007 «Молекулярные механизмы образования устойчивых некультивируемых форм бактерий».

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н., Матосова Е.В. Значение мембранных фосфолипидов в реализации защитных стратегий бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(6): 594–603.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-10>

Поступила 30.03.2020

Принята в печать 08.07.2020

## The role of membrane phospholipids in the implementation of protective strategies of bacteria

Boris G. Andryukov<sup>✉</sup>, Irina N. Lyapun, Ekaterina V. Matosova

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia

To maintain viability under stressful conditions of existence and the implementation of protective strategies, bacteria must receive signals and respond quickly to extreme changes in environmental parameters. The results of recent experimental studies complement the paradigm that has dominated since the 1970s on the predominant role of phospholipids (PL) as molecular building blocks in the formation of the cell wall of bacteria. Specific transformations of these lipid domains have shown to have a significant effect on the shape and function of cells,

membrane remodeling, and the ability of bacteria to adapt to environmental stresses. The physiological role of bacterial PLs is pleiotropic and determines both cell integrity and cell function. In addition to the key structural role of membrane PL in the cell, their intermediate metabolites are able to act as secondary messengers and perform important signaling and regulatory functions. Modern studies of the mechanisms of detection and integration of signals from the environment that cause stationary-dynamic changes in phospholipid homeostasis and form pleiotropic resistant cellular bacterial phenotypes are of fundamental and practical interest. PL homeostasis was proved to be crucial for the pathogenesis of bacterial infections and is necessary not only to maintain the viability of bacteria, but also to ensure their growth during infection. The suppression of the biosynthesis of these macromolecules reduces the viability of bacteria. In recent decades, one of the main advances in the concept of "liquid mosaic" model of biological membranes has been the understanding of their domain structure. This discovery is of fundamental and practical interest, since phospholipid domains are a promising target for modern antimicrobial strategies. The aim of this review is to summarize modern ideas about the structural, metabolic and signaling role of membrane PL in the implementation of the protective mechanisms of bacteria and maintaining their viability in adverse environmental conditions.

**Keywords:** *bacterial phospholipids; cell wall; cell membranes; remodeling; stress adaptation; stress reactions.*

**Acknowledgments.** The work was carried out within the framework of the state assignment on the topic of research work No. 0545-2019-0007 "Molecular mechanisms of the formation of stable uncultivated forms of bacteria".

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Andryukov B.G., Lyapun I.N., Matosova E.V. The role of membrane phospholipids in the implementation of protective strategies of bacteria. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(6): 594–603. (In Russ.).  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-10>

Received 30 March 2020

Accepted 08 July 2020

## Введение

В процессе эволюции микроорганизмы (МО) выработали ряд механизмов, направленных на сохранение жизнеспособности и защиту популяции от неблагоприятных условий существования в диапазоне от адаптационных морфофункциональных изменений биологических свойств до формирования устойчивых (некультивируемых) клеточных фенотипов. Основное значение в обеспечении защитных стратегий бактерий имеет клеточная стенка (КС), представляющая собой сложную гетерогенную систему и определяющая биологические свойства, форму и структурную целостность МО. Она выполняет ряд важнейших физиологических функций, обеспечивающих регуляцию взаимодействия МО с окружающей средой, и является главной мишенью для большей группы антибиотиков [1, 2].

В течение многих десятилетий КС бактерий является предметом научного интереса в связи с ее важностью для большинства прокариот и отсутствием у эукариотических клеток. Кроме того, молекулярные структурные компоненты КС патогенных бактерий играют важную роль в патогенезе инфекционных заболеваний, действуя как адгезины, рецепторы, антигены или эндотоксины [1, 3, 4]. Среди макромолекул бактерий особое значение для обеспечения жизнеспособности в различных условиях среды обитания имеют липиды — активные участники большинства биохимических процессов в клеточных мембранах, представленные в значительной степени фосфолипидами (ФЛ) [2, 3, 5].

Ключевое значение ФЛ для функционирования и выживания бактерий в экстремальных условиях

определяет высокую актуальность их изучения. Кроме того, до настоящего времени остается неисследованной роль этих липидных структур КС в интеграции сигналов среды обитания, механизмов регуляции фосфолипидного гомеостаза [4, 6, 7].

В течение последнего десятилетия (2010–2019 гг.), по данным информационных биомедицинских ресурсов MEDLINE, PubMed, PMC и Cochrane Library, наблюдался растущий научный интерес к исследованию КС бактерий и увеличение числа публикаций (14 810, ключевой запрос «bacterial cell wall»), из которых изучению ФЛ бактерий (ключевой запрос «bacteria phospholipids») было посвящено 10 397 (70,21%) статей. Значительный рост научных исследований был вызван эволюцией научных методов и появлением современных аналитических инструментов для изучения бактериальных ФЛ (твердотельного ядерно-магнитного резонанса, дифференциальной сканирующей калориметрии, масс-спектрометрии и др.) [2, 4–6].

Начало XXI в. ознаменовалось открытием доменной структуры клеточных мембран у прокариот, появлением сведений о значении ФЛ-доменов и липидных рафтов в физиологии бактерий и обеспечении их жизнеспособности в стрессовых условиях. Полученные за последние годы научные данные полностью изменили доминировавшую в конце прошлого века парадигму о преимущественной роли ФЛ как молекулярных строительных блоков мембранного бислоя. Установлено, что эти липидные компоненты КС при стрессорном воздействии среды обитания выступают в качестве вторичных мессенджеров, выполняющих важные сигнальные и регуляторные функции [6, 7].

Однако до настоящего времени истинное биологическое значение мембранных ФЛ в физиологии бактерий и адаптации к стрессу не выяснено [3, 6]. В частности, лишь недавно были получены начальные данные о роли ФЛ в распознавании сигналов из окружающей среды и их влиянии на процессы ремоделирования КС, что может иметь большое значение для разработки новых антимикробных стратегий [6, 8].

**Целью** данного обзора является обобщение современных представлений о структурной, метаболической и сигнальной роли мембранных ФЛ в реализации защитных механизмов бактерий и поддержании их жизнеспособности в неблагоприятных условиях среды обитания.

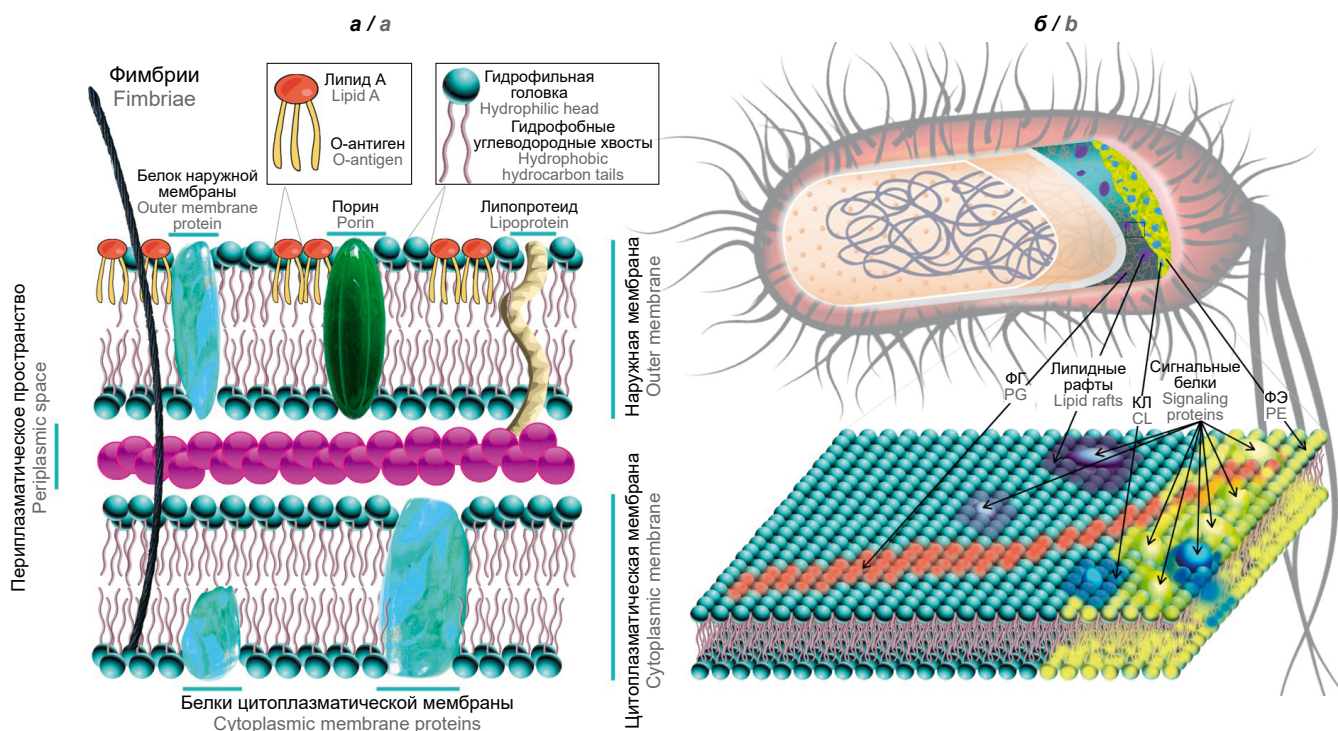
### Бактериальные мембраны и клеточные стенки

Бактерии обладают широким спектром адаптационных стратегий, направленных на сохранение жизнеспособности в экстремальных условиях существования, таких как недостаток питательных веществ или воздействие антибиотиков. Следовательно, способность воспринимать сигналы окружающей среды и быстро реагировать на колебания параметров является ключевым фактором выживания бактерий [1, 2, 5]. Механизмы быстрого реаги-

рования на стресс часто требуют значительных физиологических перестроек, включая согласованные трансформации клеточного метаболизма и ремоделирование как цитоплазматической, так и внешней мембраны (у грамотрицательных бактерий). Ключевую роль в реализации этих защитных стратегий играют ФЛ [3, 4, 6].

Раскрытие ведущей роли ФЛ в реакции бактерий на стресс следует начать с произошедшей за последние годы существенной трансформации классической модели строения их биологических мембран и КС [2, 5, 8]. Последние достижения в молекулярной биологии и микробиологической визуализации изменили взгляд на строение бактериальной клетки, а также на структурно-динамическую характеристику клеточной мембраны [4] (рисунок).

В последние годы появилась новая фундаментальная концепция, благодаря которой модель «жидкой мозаики» была расширена и дополнена рядом принципиальных положений. Стало понятно, что сложная архитектура КС и мембран основана на специфической локализации липидных паттернов и макромолекул, и это имеет ключевое значение для сохранения жизнеспособности бактерий. Например, в недавних экспериментальных исследованиях с применением флуоресцентных зондов были



Классическая модель строения мембран грамотрицательных бактерий по S.J. Singer и G.L. Nicolson (a) и современная доменная концепция этой модели (б).

КЛ — кардиолипин; ФГ — фосфатидилглицерин; ФЭ — фосфатидилэтаноламин.

The classical model of the structure of the membranes of gram-negative bacteria according to S.J. Singer and G.L. Nicolson (a) and the modern domain concept of this model (b).

CL — cardiolipin; PE — phosphatidyl-ethanolamine; PG — phosphatidyl-glycerol.

открыты области мембранных фосфолипидных доменов и липидных рафтов, отличающиеся по своим химическим структурам и функциям [6, 8]. Эти открытия сначала были сделаны на клетках эукариот, а в дальнейшем — в мембранах грамотрицательных ( $G^-$ ) и грамположительных ( $G^+$ ) бактерий.

В последующих исследованиях было установлено, что эти домены определяют гетерогенность и асимметрию клеточных мембран и имеют решающее значение для обеспечения различных жизненных процессов в бактериях [9]. Полученные за последние годы экспериментальные данные не только изменили и дополнили классическую модель Singer–Nicolson (рисунок, *a*), но и породили новые концепции [9, 10].

Известно, что КС  $G^-$ -бактерий устроена более сложно, чем у  $G^+$ -МО, и состоит из наружной и внутренней (цитоплазматической) мембран, а также периплазмы, состоящей из пептидогликана. Большая часть наружной мембраны представлена двойным слоем липидов, основным компонентом которых являются ФЛ [11, 12]. Бимолекулярная природа и амфипатический характер позволяют клеточным мембранам формировать двуслойную структуру, защищающую бактерии от влияния антимикробных агентов, но не препятствующую поступлению необходимых для роста питательных веществ [8, 13, 14].

Другим отличием является то, что оба вида бактерий содержат разные липополисахариды (ЛПС) в своих мембранах. У  $G^-$ -бактерий функциональным эквивалентом ЛПС служат липотейхоевые кислоты [2], встроенные в цитоплазматическую мембрану, в то время как у  $G^-$ -бактерий ЛПС является основным липидным компонентом внешнего слоя наружной мембраны.

Данное положение полностью соответствует модели Singer–Nicolson, однако экспериментальные данные ограничивают его обоснованность только для стационарных (точнее, стационарно-динамических) состояний клеточных мембран [10, 13]. Проведенные за последние десятилетия исследования позволили установить, что их качественный и количественный состав не является статичным и может значительно трансформироваться в ответ на изменение условий среды обитания [3, 6, 8, 14].

При некоторых состояниях бактериальной клетки, в том числе вызванных экстремальными условиями среды обитания, меняются пространственная организация и ремоделирование мембран с образованием (в результате так называемого мембранного синтеза) временных мембранных однослойных структур при активном мембранно-деформирующем участии ФЛ (наряду с белками) и формированием фосфолипидных доменов кардиолипина (КЛ), фосфатидилглицерина (ФГ) и других липидных кластеров, наделенных специфическими функциями [7, 14, 15]. Например, домены КЛ у *E. coli* в бак-

териальных мембранах на полюсах клеток влияют на полярную локализацию многих белков [15]

Как установили L. Danne с коллегами (2017) на модели  $G^-$ -бактерий, при наступлении стрессовых условий культивирования согласованный мембранный синтез происходит внутри как цитоплазматической, так и наружной мембраны [14].

Трансформация пространственной архитектуры и реструктуризация бактериальных мембран стали новыми областями для исследований в молекулярной микробиологии [7, 8, 12, 14]. Согласно современным представлениям, уникальная способность КС прокариот формировать неламинарные однослойные структуры в результате биохимических реакций мембранного синтеза, проходящих внутри клеточных мембран, имеет решающее значение для выживания и адаптации бактерий [3]. При этом ведущая роль в ремоделировании мембраны у бактерий принадлежит качественным и количественным изменениям спектра ФЛ, благодаря чему в последние годы появилось понятие фосфолипидного (липидного) гомеостаза бактерий [11, 16, 17].

### Фосфолипидный гомеостаз бактерий

Способность бактерий контролировать и трансформировать гомеостаз ФЛ, как и других жизненно важных соединений, позволяет им обитать в широком диапазоне условий окружающей среды. ФЛ занимают основную и важную часть клеточных мембран, не только обеспечивая их вязкость, механическую прочность и кривизну, но и активно регулируя функции мембранных протеинов, входящих в состав многочисленных рецепторов, ферментов и транспортеров, а также межбелковых взаимодействий [16–18].

Несмотря на значительное разнообразие в клетках прокариот ФЛ-структур, большинство из них являются глицеролипидами, содержащими две цепи жирных кислот. Типичные молекулы ФЛ состоят из обращенной наружу отрицательно заряженной гидрофильной фосфатной головной группы, присоединенной к глицерину, и двух гидрофобных ацильных цепочек-хвостов — неполярных жирных кислот, обращенных внутрь клетки. Подобное расположение амфипатических ФЛ обеспечивает образование плотной физико-химической мембранной структуры, непроницаемой для водорастворимых веществ внеклеточной среды и требуемой для концентрации необходимых для жизнедеятельности молекул в цитоплазме [14, 16, 18]. Кроме того, длина цепи и степень насыщенности жирных кислот, входящих в структуру ФЛ, модулируют толщину и текучесть биомембран [1, 14, 18].

Синтезируемый бактериями спектр ФЛ мажорно представлен фосфатидилэтаноламином (ФЭ), ФГ и дифосфатидилглицерином (КЛ), отличаю-

щимися количеством и длиной ацильных цепей, числом, положением и геометрией ненасыщенных связей, а также структурой, полярностью и зарядом головных частей [2, 6, 14]. Кроме того, для ФЛ-гомеостаза и функционирования бактериальных мембран имеет значение лизофосфатидилэтанолламин (ЛФЭ) — метаболический интермедиат, который образуется при гидролизе ФЭ или дегградации мембран и входит в состав минорных групп ФЛ [11]. При особых условиях (например, при бактериальном стрессе) относительное содержание ЛФЭ может увеличиваться в КС и превышать физиологические следовые концентрации ( $\leq 1\%$ ).

Кроме основных групп, бактерии синтезируют дополнительные, менее распространенные ФЛ, такие как фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол [1]. ФЛ-гомеостаз детерминирован мембранно-белковой архитектурой. Относительное содержание ФЛ варьирует у разных типов (видов) бактерий, а их баланс жестко контролируется, в том числе регуляцией активности ферментов-синтаз, участвующих в биосинтезе. Изменение ФЛ-гомеостаза приводит к нарушению проницаемости клеточных мембран, транспорта белков и электронов, нарушению деления клетки [11].

Для различных видов Гр<sup>-</sup>-бактерий цвиттер-ионный ФЭ является преобладающим ФЛ, в то время как анионные ФГ и КЛ больше распространены у Гр<sup>+</sup>-МО [5]. Установлено (на модели *E. coli*), что мембраны Гр<sup>-</sup>-бактерий состоят примерно из 70–75% ФЭ, 20–25% ФГ и 0–10% КЛ [13, 19]. Это соотношение является относительно постоянным, за исключением периода перехода клеток в стационарную фазу роста, а также случаев, когда увеличивается содержание КЛ [10, 12, 15]. Перечисленные ФЛ совместно с ЛПС составляют липидный кластер, входящий в сложную макромолекулярную структуру, которая является барьером проницаемости и защитой бактериальной клетки от влияния экстремальных условий, а также создает избирательную проницаемость для веществ, необходимых для жизнеобеспечения бактерий [8, 20].

В отличие от ЛПС, большая часть которых находится в составе внешней мембраны (основной компонент), ФЛ входят в состав как внешней, так и внутренней мембраны (вместе с  $\alpha$ -спиральными белками). Здесь они составляют более 95% липидов, иницируя сигнальные каскады биохимических реакций при бактериальном стрессе [8, 12, 14].

Липидный гомеостаз мембран, который имеет важное значение для сохранения жизнеспособности бактерий, обеспечивается скоординированными процессами транспорта и синтеза. В отличие от ЛПС, синтез которых изучен достаточно хорошо, механизмы сборки ФЛ исследованы в меньшей степени [9, 11, 12]. При этом большая часть исследований проводилась на основной биологической

модели — *E. coli*, а полученные результаты интерполировались на все Гр<sup>-</sup>-бактерии (у Гр<sup>+</sup>-МО синтез имеет некоторые отличия) [13].

У бактерий, как и у всех организмов, биосинтез ФЛ начинается с ацилирования глицерол-3-фосфата с образованием фосфатидной кислоты. Она является ключевым предшественником образования основных ФЛ у бактерий. В дальнейшем фосфатидная кислота превращается в цитидин-дифосфат-диацилглицерид (CDP-DAG) с участием фермента CDP-диглицерид-синтазы (CdsA). CDP-DAG является предшественником основного ион-биполярного фосфолипида — ФЭ и конечных анионных фосфолипидов — ФГ и КЛ. Дифосфатидилглицерин (КЛ) образуется в результате конденсации двух молекул ФГ [5, 13, 14]. Все реакции синтеза ФЛ происходят на цитоплазматической мембране, и все ключевые интермедиаты, такие как фосфатидная кислота и CDP-DAG, также связаны с мембраной [5, 13, 14, 18].

Биосинтез ФЛ, имеющий важное значение не только для сохранения жизнеспособности бактерий, но и для поддержания их роста в период инфекции, в последние годы стал одним из перспективных направлений поиска новых антимикробных мишеней. Помимо ключевой структурной роли этих липидных доменов в клетке промежуточные метаболиты ФЛ могут выступать в качестве вторичных мессенджеров и выполнять важные регуляторные функции [8, 21, 22].

Двуслойная мембранная архитектура не только обеспечивает механическую прочность и целостность бактериальных клеток, но и влияет на топологию мембранных белков, функция которых имеет выраженную ФЛ-зависимость [9, 14]. Она опосредована, с одной стороны, связывающим действием ФЛ, играющих роль «гидрофобного клея» для белковых молекул (например, КЛ стабилизирует комплексы транслокационных белков SecYEG) [4, 13, 16], а с другой — наличием связанных ФЛ-компонентов в структуре многих мембранных белков [21, 23].

Это связано не только с их особой ролью в блок-ФЛ-опосредованном ремоделировании клеточных мембран, но и с модуляцией функций мембранных белков, многие из которых имеют ФЛ в своей структуре [21, 23]. Белок-ФЛ-связи обеспечиваются гидрофобными взаимодействиями (например, интегральная мембранно-натриевая антипортёрная структура с молекулой ФЭ в составе) [14] или посредством зарядовых взаимодействий (например, мембранно-интегральный носитель митохондриального аденозинтрифосфата, имеющий в составе КЛ) [9, 24].

Таким образом, за десятилетия изучения липидных доменов бактерий накопилось достаточно много информации о химических и физических



Данные о функциях и участии ФЛ в жизнеобеспечении бактериальных клеток, полученные на основе молекулярно-генетической трансформации генов, кодирующих биосинтез ФЛ

Information on the functions and participation of phospholipids in the life support of bacterial cells obtained on the basis of molecular genetic manipulation

Генетическая трансформация Genetic manipulation	ФЛ Phospholipids	Основные функции в клетке Main functions in the cell	Источники Sources
+ <i>pssA</i>	ФЭ Phosphatidyl-ethanolamine	Обеспечивает целостность мембран, поверхностный и электрохимический потенциал, гидрофобность; чувствительность к внутриклеточному подкислению Provides membrane integrity, surface and electrochemical potential, hydrophobicity; sensitivity to intracellular acidification	[19]
Δ <i>pssA</i>	ФЭ Phosphatidyl-ethanolamine	Отсутствие проявляется дефектами клеточного деления, энергетического обмена и нарушением структурной организации. Нарушение подвижности бактерий и хемотаксиса. Нарушение функции вторичных транспортеров (сахаров и аминокислот) Its absence is manifested by defects in cell division, energy metabolism and a violation of structural organization. Impaired motility of bacteria and chemotaxis. Dysfunction of secondary transporters (sugars and amino acids)	[20, 25, 26]
Δ <i>psd</i>	ФЭ Phosphatidyl-ethanolamine	Отсутствие приводит к модуляции температурной чувствительности, нарушению целостности КС и мембран, авирулентности (мыши) Its absence leads to modulation of temperature sensitivity, to disruption of the integrity of the cell wall and membranes, and avirulence (in mice)	[8]
Δ <i>pgsA</i>	ФГ и КЛ Phosphatidyl-glycerol and cardiolipin	Отсутствие вызывает нарушение синтеза белка наружной мембраны, деления клеток, энергетического обмена и осмотической регуляции, снижению жизнеспособности бактерий. Нарушение синтеза приводит к термочувствительному дефекту роста при 42°C Its absence causes a disturbance in the synthesis of the outer membrane protein, cell division, energy metabolism and osmotic regulation, and a decrease in bacterial viability. Suppression of the synthesis leads to a heat-sensitive growth defect at 42°C	[14, 24]
+ <i>pssA</i>	Фосфатидилсерин Phosphatidylserine	Повышает толерантность к промышленным ингибиторам синтеза ФЛ Increases tolerance to industrial inhibitors of phospholipid synthesis	[19]
Δ <i>clsA</i>	КЛ Cardiolipin	Выявлено участие в модуляции активности и кодировании КЛ-синтазы и дегидрогеназы, а также регуляции скорости окислительного фосфорилирования и ремоделирования мембран. Потеря жизнеспособности после длительной инкубации в стационарной фазе роста Participation in the modulation of activity and coding of cardiolipin synthase and dehydrogenase, as well as the regulation of the rate of oxidative phosphorylation and remodeling of membranes. Loss of viability after prolonged incubation in the stationary growth phase	[20, 22]
+ <i>clsA</i>	КЛ Cardiolipin	Снижение мембранного потенциала, возможная потеря жизнеспособности, нарушение барьерной функции КС Decreased membrane potential, possible loss of viability, impaired barrier function of the cell wall	[20, 22]
Δ <i>clsBC</i>	КЛ Cardiolipin	Уменьшает длину бактериальной клетки на 20% и снижает биосинтез липида II на 20%. Повышает чувствительность бактерий к антибиотикам Reduces bacterial cell length by 20% and reduces lipid II biosynthesis by 20%. Increases bacteria sensitivity to antibiotics	[23, 24]

**Примечание.** (+) — повышенная экспрессия генов; Δ — низкая экспрессия генов (нокауты).  
**Note.** (+) — hybrid models; Δ — knockouts (mutants).

свойствах, а также о структурном разнообразии клеточных ФЛ и механизмах, контролируемых динамическое постоянство состава клеточных мембран. Однако до последнего времени не было исследовано, каким образом эти свойства опосредуют биологические функции ФЛ. Кроме того, были неизвестны роль и значение каждого из них для физиологии, жизнеспособности или целостности бактериальной клетки. Эти исследования стали доступны после использования молекулярно-генетических подходов.

### Молекулярно-генетические подходы, направленные на целевое модулирование биосинтеза фосфолипидов

Быстрое развитие молекулярной генетики с середины 1970-х гг. позволило разработать первые рекомбинантные штаммы *E. coli*, которая является наиболее распространенной модельной системой для изучения функции ФЛ. Трансформация спектра бактериальных фосфолипидов (ФЭ, ФГ, КЛ, фосфатидилсерина и фосфатидилхолина) достигалась

путем создания нулевых мутантов соответствующих генов, кодирующих мембранные ферменты, катализирующие ключевые реакции биосинтеза ФЛ [20, 23, 25]. Целью этих исследований было решение вопроса о функциях или необходимости специфических ФЛ для сохранения жизнеспособности бактерий в неблагоприятных условиях среды обитания, в том числе в результате воздействия антибиотиков [20, 22, 24].

История изучения бактериального метаболизма ФЛ и роли отдельных липидных кластеров для жизнедеятельности клеток является удачным примером соединения энзимологии и генетики. Это сотрудничество наиболее плодотворно проявилось в конце XX в. в группах исследователей во главе с А. Kornberg и Е. Kennedy [20].

Систематическая генетическая трансформация спектров ФЛ бактериальных клеток путем нацеливания на гены, кодирующие ферменты биосинтеза ФЛ, позволила проверить их функцию *in vivo* и выявить новые роли в жизнеобеспечении бактерий на молекулярном уровне (таблица) [20, 25, 26].

Для исследования специфической реакции бактериальной клетки на стресс в условиях дефицита целевых ФЛ авторы применили анализ репортерных генов для дозозависимых характеристик, вестерн-блоты и измерения вторичных мессенджеров для выявления численности и активности ключевых регуляторов [20, 24]. Полученные данные свидетельствуют о том, что ФЭ- и КЛ-дефицитные клетки активируют различные молекулярно-морфологические механизмы стрессового ответа [22, 24, 25].

Z.D. Dalebroux с коллегами, изучая реакцию на стресс *E. coli* в модельных условиях дефицита ФЭ, обнаружили значительные изменения в морфологии и структуре КС, сокращение длины цепи антигена О, снижение мембранного потенциала, метаболической активности и гиперспособности к формированию биопленки по сравнению с контрольным штаммом [7]. Установлено, что дефицит или удаление ФЭ вызывали плейотропное действие, выраженность которого зависела от экспрессии гена *pssA*, кодирующего синтез фосфатидилсеринсинтазы, катализирующей синтез этого ФЛ [7, 20].

В последующих исследованиях установлено, что синтез КЛ у бактерий является сложным процессом, зависящим от трех изоформ КЛ-синтазы (ClsABC), которые катализируют продукцию КЛ в стационарной фазе [11]. В условиях дефицита этого ФЛ у *E. coli* при реакции на стресс происходят морфофизиологические трансформации в клетке, однако у этих мутантов выявлена более длинная цепь антигена О, которая восстанавливалась после индукции гена *clsA*, кодирующего синтез КЛ-синтазы, а также (в отличие от дефицита ФЭ) снижение спо-

собности к формированию биопленки, устойчивости к воздействию перекиси водорода и щелочной рН, осмотическому стрессу и органическим растворителям [11, 20]. Кроме того, дефицит КЛ приводил к нарушению организации и активности мембранных белков, участвующих в окислительном фосфорилировании у бактерий [12].

Появление новых сведений о специфических мембранных функциях ФЛ произошло благодаря формированию единого комплексного подхода к изучению их роли в физиологии бактерий [8]. Результаты использования молекулярно-генетических подходов и методов микробиологической визуализации, полученные в последние годы, позволили установить, что нарушение ФЛ-гомеостаза приводит к выраженным изменениям макромолекулярного состава бактериальных клеток, сопровождаемым эндогенным стрессом и выраженным плейотропным клеточным эффектом [20, 26]. Кроме того, комплексное изучение ФЛ-зависимой бактериальной адаптации выявило важность липидного состава бактериальных мембран для поддержания формы и размера клеток, а также их связь с метаболизмом при экзогенном стрессе [8, 20, 27].

Эти ФЛ-зависимые эффекты включают не только изменения мембранных транспортно-синтетических путей, но и, как показало изучение генетически измененных штаммов, замедление скорости биосинтеза мембран, нарушение клеточной адгезии [20, 26].

Например, экспериментальные исследования Е. Mileykovskaya с коллегами на изолятах с нокаутрованными генами  $\Delta pssA$  и  $\Delta clsA$  показали, что у бактериальных клеток, лишенных ФЭ или КЛ, происходило увеличение гетерогенности размеров и полиморфности в условиях сниженной доступности питательных веществ [24]. Кроме того, нарушение ФЛ-гомеостаза приводило к нарушению формирования биопленки, реализации множественных путей защитных стратегий против внешних стрессов окружающей среды, повышению чувствительности к антимикробным веществам [20, 24].

В другом исследовании D.K. Giles с коллегами установили, что когда клетки Гр<sup>-</sup>-возбудителя холеры *Vibrio cholerae* подвергались воздействию желчи, у них наблюдалось сопутствующее изменение уровней ФЭ (снижение) и КЛ (увеличение) с последующим ремоделированием клеточных мембран [26]. Аналогичные мембранные трансформации происходят и у других Гр<sup>-</sup>-патогенов при взаимодействии с иммунной системой макроорганизма или при воздействии антимикробных веществ [20].

V.W. Rowlett с коллегами установили, что механизм, побуждающий к началу изменения ФЛ-гомеостаза у бактерий и последующей мембранной реструктуризации, связан с активацией двухкомпонентных систем PhoPQ и PmrAB, реагирующих

на внешние стрессоры и запускающих экспрессию соответствующих генов [8]. В недавнем исследовании, проведенном авторами, было показано, что при нарушении синтеза мембранных ФЛ активация PhoPQ в стрессовых условиях не происходит, бактериальные клетки теряют способность к ремоделированию мембран и реализации многочисленных механизмов ответа на стресс [8].

### Фосфолипидные домены клеточных мембран и классическая модель «жидкой мозаики»

В последние годы появилась новая фундаментальная концепция, уточняющая классическую молекулярную флюидно-мозаичную модель («жидкой мозаики») клеточных структур (Singer–Nicolson), которая была предложена около полувека назад [4]. Эта старая, но остающаяся в силе модель основана на постулате о диффузионной подвижности и равномерном распределении в однородной клеточной мембране двойного липидного слоя, являющегося «морем липидов» с плавающими в нем белками [2, 4] (рисунок, а).

В начале XXI в. эта модель была расширена и дополнена рядом принципиальных положений. Установлено, что сложная архитектура КС и мембран не является «морем липидов», а основана на специфической локализации высокоуровневых макромолекулярных доменов, обеспечивающих многие клеточные функции, имеющие ключевое значение для сохранения жизнеспособности бактерий [3, 6, 22] (рисунок, б).

Например, в экспериментальных исследованиях с применением флюоресцентных зондов были открыты области мембранных ФЛ-доменов, отличающихся по своему липидному составу (липидные домены) [6, 20, 25], и рафты (плоты) [28], различные по физическим характеристикам (отрицательной или положительной кривизне) [27] или электрическому потенциалу [26]. Эти исследования показали важнейшую роль ФЛ-доменов для клеток и поставили под сомнение флюидно-мозаичную модель Singer–Nicolson сначала для эукариотических [22, 24], а позднее — для бактериальных клеток, где эти домены играют роль мишеней для специфической локализации белковых комплексов [11, 15, 29].

Современные исследования [15, 18, 22] с использованием масс-спектрометрии и тандемной масс-спектрометрии на моделях *E. coli*, *P. aeruginosa* и *B. subtilis* показали, что ФЛ-состав бактериальных мембран может резко изменяться в процессе жизненного цикла бактерий. Как показали исследования, проведенные с помощью мембранных модельных систем и гидрофобного флюоресцентного красителя 10-N-ноналакридинового оранжевого, расположение в бактериальных мембранах КЛ-доменов неравномерно — преимущественно в

полярных и перегородочных областях, что обеспечивает выполнение ими специфических функций [19, 20, 25].

При воздействии на бактерии аминокликозидов происходило перемещение и кластеризация КЛ-доменов без изменения текучести мембран. При этом реализовались функции, контролируемые КЛ: ингибирование дыхательной цепи и изменения формы бактерий (уменьшение длины и увеличение кривизны) [21, 23, 24]. Эти результаты представляют большой интерес для разработки новых перспективных антимикробных стратегий, нацеленных на ингибирование синтеза КЛ.

При исследовании доменов ФГ в основном использовались ФЛ-специфические катионные красители серии FM (FM4-64, FM1-43 и FM5-95), которые локализовались в спиральных липидных структурах клеточной мембраны в клетках *B. subtilis*, где индуцировалась экспрессия гена *pgsA* [6, 11, 20]. Выявлено, что преимущественная локализация ФГ в спиральных структурах *B. subtilis* сопровождалась увеличением концентрации в этих паттернах и ключевых белков клеточного деления FtsA и FtsZ [6].

Эти открытия побудили исследовать локализацию ФЭ с циклическим пептидным зондом Ro09-0198, который специфически связывается с этими ФЛ [1, 8, 9]. Обработка биотинилированным Ro09-0198 с последующим конъюгированным с тетраметил-родамином стрептавидином показала, что ФЭ-домены локализуются в перегородочных мембранах вегетативных клеток *E. coli*, а также в мембранах полярной перегородки и оболочечных мембранах спорующих клеток *B. subtilis*. В этих же клеточных паттернах локализовались и большинство фосфатидилсеринсинтаз, катализирующих синтез данных ФЛ [28, 30].

Важной особенностью современной концепции строения клеточной мембраны стало открытие липидных рафтов (плотов) — микродоменов — локализации вокруг определенных сигнальных белков определенных видов липидов. Эти кластеры липидного бислоя, вкрапленные на поверхности ФЛ, были в начале XXI в. обнаружены в эукариотических клетках (что было расценено как эволюция клеточной сложности), где определены их сигнальные функции. В последующие годы эквивалентные микродомены выявлены и в бактериальных клетках [25, 27].

Используя метод жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим анализом, исследователи обнаружили у *B. subtilis* функциональную скваленсинтазу YisP, кодируемую геном *yisp*. Дальнейшие исследования показали, что функциональные липидные рафты в бактериальных мембранах, как и в эукариотических, координируют клеточные сигнальные пути секреции белков и их транспорта, обеспечивая адаптационные реакции и жизнеспособность МО [25, 29]. Кроме того, обнару-



жено, что некоторые патогенные бактерии выработали ряд механизмов использования липидных рафтов для проникновения в клетки макроорганизмов и индукции инфекционных заболеваний [27, 28].

Открытие рафтов в составе мембран позволило по-новому взглянуть на известную проблему современной мембранологии — зависимость функционирования мембранных белков от липидного состава мембран, сбалансированного таким образом, чтобы создать необходимые условия для корректной и эффективной работы мембранных белков. Высокое содержание сигнальных белков в рафтовой зоне свидетельствует об их участии в регуляции мембранных процессов [27].

Таким образом, благодаря современным аналитическим технологиям было установлено, что многие макромолекулы в бактериальных клетках имеют специфическую локализацию. В частности, наличие определенных мембранных ФЛ-доменов является важным дополнением существующей классической модели «жидкой мозаики». Изучение значения этих кластеров для жизнеспособности бактериальных клеток еще не закончено, но уже установлено, что эти домены и рафты играют ведущую роль в обеспечении важнейших клеточных процессов, включая деление, передачу сигналов, споруляцию, включение адаптивных реакций на внешние стрессоры и др.

### Фосфолипидные домены и современные антимикробные стратегии

Бактериальные мембраны представляют собой основной барьер, защищающий внутриклеточные структуры от антимикробных агентов, и поэтому являются главными мишенями в механизмах токсического действия многих антибиотиков [1, 2, 8]. Их воздействие направлено на повреждение или разрушение бактериальных мембран, что является следствием нарушения организации липидного бислоя [28, 30].

Однако в последние десятилетия увеличивающаяся антибиотикорезистентность патогенных МО все чаще снижает эффективность проводимого этиологического лечения бактериальных инфекций и стимулирует разработку альтернативных антибактериальных технологий [23].

Недавно была предложена новая антимикробная стратегия, связанная с использованием антимикробных поликатионных агентов, специфический механизм действия которых направлен на разделение анионных липидных кластеров. Это приводит к образованию в мембране сквозных дефектов (пор) в результате замедления диффузных процессов и фазового перехода в области ФЛ-доменов и липидных рафтов, а также их последующей сегрегации [28, 29].

Указанные трансформации вызывают, с одной стороны, повышение проницаемости мембран для

антимикробных агентов и дестабилизацию структуры бислоя, а с другой стороны, разрушение липидных макромолекул, что снижает жизнеспособность бактерий [28]. В качестве перспективных поликатионных агентов в последние годы изучается использование некоторых антимикробных пептидов [29].

### Заключение

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод, что ФЛ-гомеостаз имеет ключевое значение для жизнеобеспечения сложной системы адаптации МО, управления механизмами ремоделирования клеточных мембран. В последние десятилетия одним из главных достижений в концепции модели биологических мембран на основе «жидкой мозаики» стало понимание их доменной структуры. В свете новой концепции все большее внимание уделяется изучению ФЛ-кластеров бактериальных мембран, что имеет фундаментальное и практическое значение.

Дальнейшие исследования механизмов обнаружения и интегрирования сигналов из окружающей среды определяются важностью эффективного функционирования ФЛ-доменов, и раскроют патогенетический механизм многих заболеваний: атеросклероза, рака, диабета, болезни Альцгеймера и др.

Новые представления о непосредственном и активном участии мембранных ФЛ в реализации защитных стратегий бактериальной клетки имеют важное значение для последующей разработки новых мишеней — ФЛ-доменов — для антимикробной терапии в условиях угрожающего роста резистентности МО к традиционным антибиотикам. Современные инновационные стратегии нацелены на анионные ФЛ-домены с помощью некоторых катионных антимикробных пептидов, которые нарушают их стабильность и снижают жизнеспособность бактерий.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sohlenkamp C., Geiger O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 2016; 40(1): 133–59. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>
2. Dörr T., Moynihan P.J., Mayer C. Editorial: bacterial cell wall structure and dynamics. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2051. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02051>
3. Abellón-Ruiz J., Kaptan S.S., Baslé A., Claudi B., Bumann D., Kleinekathöfer U., et al. Structural basis for maintenance of bacterial outer membrane lipid asymmetry. *Nat. Microbiol.* 2017; 2(12): 1616–23. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0046-x>
4. Nicolson G.L. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1838(6): 1451–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.019>
5. Slavetinsky C., Kuhn S., Peschel A. Bacterial aminoacyl phospholipids – biosynthesis and role in basic cellular processes and pathogenicity. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 2017; 1862(11): 1310–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.11.013>
6. Barák I., Muchová K. The role of lipid domains in bacterial cell processes. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(2): 4050–65. <https://doi.org/10.3390/ijms14024050>

7. Dalebroux Z.D. Cues from the membrane: bacterial glycerophospholipids. *J. Bacteriol.* 2017; 199(13): e00136-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00136-17>
8. Rowlett V.W., Mallampalli V.K.P.S., Karlstaedt A., Dowhan W., Taegtmeier H., Margolin W., et al. Impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function and bacterial stress adaptation. *J. Bacteriol.* 2017; 199(13): e00849-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00849-16>
9. Vitrac H., Mallampalli V.K.P.S., Dowhan W. Importance of phosphorylation/dephosphorylation cycles on lipid-dependent modulation of membrane protein topology by posttranslational phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2019; 294(49): 18853–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010785>
10. Bishop R.E. Phospholipid middle management. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(10): 1608–9. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0570-y>
11. Sastre D.E., Basso L.G.M., Trastoy B., Cifuentes J.O., Contreras X., Gueiros-Filho F., et al. Membrane fluidity adjusts the insertion of the transacylase PlsX to regulate phospholipid biosynthesis in Gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(7): 2136–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011122>
12. Exterkate M., Caforio A., Stuart M.C.A., Driessen A.J.M. Growing membranes in vitro by continuous phospholipid biosynthesis from free fatty acids. *ACS Synth. Biol.* 2018; 7(1): 153–65. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00265>
13. Tang Y., Xia H., Li D. Membrane phospholipid biosynthesis in bacteria. In: Cao Y., eds. *Advances in Membrane Proteins*. Singapore: Springer; 2018: 77–119. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0532-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0532-0_4)
14. Danne L., Aktas M., Unger A., Linke W.A., Erdmann R., Narberhaus F. Membrane remodeling by a bacterial phospholipid-methylating enzyme. *mBio.* 2017; 8(1): e02082-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02082-16>
15. Parsons J.B., Rock C.O. Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Prog. Lipid Res.* 2013; 52(3): 249–76. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.02.002>
16. Shrivastava R., Jiang X., Chng S.S. Outer membrane lipid homeostasis via retrograde phospholipid transport in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2017; 106(3): 395–408. <https://doi.org/10.1111/mmi.13772>
17. Coleman G.A., Pancost R.D., Williams T.A. Investigating the origins of membrane phospholipid biosynthesis genes using outgroup-free rooting. *Genome Biol. Evol.* 2019; 11(3): 883–98. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz034>
18. Tan Z., Khakbaz P., Chen Y., Lombardo J., Yoon J.M., Shanks J.V., et al. Engineering *Escherichia coli* membrane phospholipid head distribution improves tolerance and production of biorenewables. *Metab. Eng.* 2017; 44: 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017>
19. Dowhan W. Understanding phospholipid function: why are there so many lipids? *J. Biol. Chem.* 2017; 292(26): 10755–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.X117.794891>
20. Robertson R.M., Yao J., Gajewski S., Kumar G., Martin E.W., Rock C.O., et al. A two-helix motif positions the active site of lysophosphatidic acid acyltransferase for catalysis within the membrane bilayer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017; 24(8): 666–71. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3436>
21. Lin T.Y., Gross W.S., Auer G.K., Weibel D.B. Cardiolipin alters *Rhodobacter sphaeroides* cell shape by affecting peptidoglycan precursor biosynthesis. *mBio.* 2019; 10(1): e02401-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02401-18>
22. Tan B.K., Bogdanov M., Zhao J., Dowhan W., Raetz C.R.H., Guan Z. Discovery of a novel cardiolipin synthase in *Escherichia coli* utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(41): 16504–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212797109>
23. El Khoury M., Swain J., Sautrey G., Zimmermann L., Van Der Smissen P., Décout J.L., et al. Targeting bacterial cardiolipin enriched microdomains: an antimicrobial strategy used by amphiphilic aminoglycoside antibiotics. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 10697. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10543-3>
24. Mileykovskaya E., Ryan A.C., Mo X., Lin C.C., Khalaf K.I., Dowhan W., et al. Phosphatidic acid and N-acylphosphatidylethanolamine form membrane domains in *Escherichia coli* mutant lacking cardiolipin and phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(5): 2990–3000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805189200>
25. Pogmore A.R., Seistrup K.H., Strahl H. The Gram-positive model organism *Bacillus subtilis* does not form microscopically detectable cardiolipin-specific lipid domains. *Microbiology.* 2018; 164(4): 475–82. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000639>
26. Giles D.K., Hankins J.V., Guan Z., Trent M.S. Remodelling of the *Vibrio cholerae* membrane by incorporation of exogenous fatty acids from host and aquatic environments. *Mol. Microbiol.* 2011; 79(3): 716–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07476.x>
27. Bramkamp M., Lopez D. Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015; 79(1): 81–100. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-14>
28. Epan R.M., Epan R.F. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1788(1): 289–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2008.08.023>
29. Matsuzaki K., ed. *Antimicrobial Peptides: Basics for Clinical Application*. Kyoto: Springer; 2019.
30. Ursell T.S., Klug W.S., Phillips R. Morphology and interaction between lipid domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(32): 13301–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903825106>

#### Информация об авторах

Андрюков Борис Георгиевич<sup>✉</sup> — д.м.н., в.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>. E-mail: andrukov\_bg@mail.ru

Ляпун Ирина Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>. E-mail: irina-lyapun@list.ru

Матосова Екатерина Владимировна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>. E-mail: e\_matosova@mail.ru

**Участие авторов:** все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

#### Information about the authors

Boris G. Andrukov<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>. E-mail: andrukov\_bg@mail.ru

Irina N. Lyapun — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>. E-mail: irina-lyapun@list.ru

Ekaterina V. Matosova — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>. E-mail: e\_matosova@mail.ru

**Contribution:** the authors contributed equally to this article.