

## ПРОТЕОМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ *Bacillus pumilus* 3-19

© 2024 г. У. Курди<sup>а</sup>, П. В. Зеленихин<sup>а</sup>, Г. Ю. Яковлева<sup>а</sup>, М. Н. Синягина<sup>а</sup>,  
А. И. Колпаков<sup>а</sup>, О. Н. Ильинская<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

\*e-mail: [Ilinskaya\\_kfu@mail.ru](mailto:Ilinskaya_kfu@mail.ru)

Поступила в редакцию 01.08.2023 г.

После доработки 06.09.2023 г.

Принята к публикации 07.09.2023 г.

Внеклеточные мембранные везикулы являются важным фактором коммуникации в бактериальных популяциях и при взаимодействии бактерий с хозяином. Везикулы как носители различных регуляторных и сигнальных молекул обуславливают возможность их использования в качестве биомаркеров заболеваний и перспективных терапевтических агентов, в том числе вакцинных препаратов. Состав мембранных везикул расшифрован у ограниченного числа грамотрицательных и грамположительных бактерий. В данной работе впервые выделены, визуализированы и охарактеризованы внеклеточные мембранные везикулы стрептомициноустойчивого штамма *Bacillus pumilus* 3-19, продуцента внеклеточной гуанилпредпочитающей рибонуклеазы – биназы. Установлено, что в везикулах отсутствует генетический материал, а спектр белков зависит от содержания фосфата в среде культивирования. Везикулы, продуцируемые бактериями, которые росли на среде с дефицитом фосфата, несут 49 уникальных белков, на среде с высоким содержанием фосфата – 101 белок. Оба типа везикул включают 140 общих белков. В везикулах идентифицированы флагеллярные белки, РНКазы J – основной фермент РНК-деградосомы, фосфатазы, пептидазы, транспортеры железа, сигнальные пептиды. Белки антибиотикорезистентности и амилоидоподобные белки, которые присутствуют в клетках *B. pumilus* 3-19, в везикулах не обнаружены. Биназа, индуцируемая дефицитом фосфата, обнаружена только в составе везикул, полученных на среде с дефицитом фосфата.

**Ключевые слова:** внеклеточные мембранные везикулы, *Bacillus pumilus*, геном, протеом, РНКазы, биназа, флагеллярные белки, амилоидоподобные белки

DOI: 10.31857/S0026898424010186, EDN: NRBQXZ

### ВВЕДЕНИЕ

Большинство бактерий обладают способностью продуцировать сферические мембранные наночастицы диаметром от 20 до 400 нм, называемые мембранными везикулами (МВ). МВ содержат различные молекулы и выполняют определенные функции, включая транспорт факторов вирулентности, перенос ДНК, перехват бактериофагов, антибиотиков и эукариотических факторов защиты хозяина, детоксикацию клеток и коммуникацию бактерий [1]. Впервые МВ, образующиеся путем вздутия и пузырения (блеbbing) внешней мембраны, были обнаружены у грамотрицательных бактерий. Недавно описаны везикулы грамотрицательных бактерий, формирующиеся из обеих мембран (наружной и вну-

тренней) в результате запускаемого эндолизином лизиса клеток [2]. Грамположительные бактерии также секретируют везикулы, которые образуются из цитоплазматической мембраны, однако их изучение было начато позднее, поскольку значительный слой муреина в клеточной стенке этих бактерий обуславливает низкую продукцию МВ [3].

Исследование состава МВ представляет значительный интерес, поскольку раскрывает особенности взаимодействия между бактериальными клетками, а также взаимодействия бактерий с клетками эукариотических организмов, в том числе и в системе патоген–хозяин. В состав везикул входят не только компоненты внешней мембраны – липополисахариды, фосфолипиды, белки, но и белки периплазмы, некоторые цитоплазматические ферменты и нуклеиновые кислоты. Вариабельный состав МВ свидетельствует о еще нераскрытом потенциале их практического использования, в частности в качестве новых

Сокращения: МВ – мембранные везикулы; LPM – среда с низким содержанием фосфата; НРМ – среда с высоким содержанием фосфата.

биомаркеров заболеваний, а также для создания неклеточных вакцин.

Расшифрован протеомный состав МВ грамотрицательных бактерий *Bacteroides thetaiotaomicron* [4], *Fusobacterium nucleatum* [5], *Haemophilus parasuis* [6], *Burkholderia multivorans* [7]. Методами синтетической биологии создан штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)Δ60, продуцирующий МВ с минимизированным протеомом, лишенным 59 эндогенных белков способный нести до 30% рекомбинантных белков как базовый штамм для получения новых вакцинных препаратов [8].

Проведен анализ протеома везикул таких грамположительных бактерий, как *Staphylococcus aureus* [9, 10], *Streptococcus pneumoniae* [11], *Bacillus subtilis* [12], *Granulicatella adiacens* [13].

*B. pumilus* – известный продуцент внеклеточной рибонуклеазы (РНказы), которая обладает противоопухолевыми [14–16] и противовирусными свойствами [17–20]. Продукция МВ и их состав у этой бактерии неизвестны.

В настоящей работе подтверждена возможность образования МВ стрептомицинустойчивым штаммом *B. pumilus* 3-19 и проанализирован состав этих МВ. В особую задачу выделено сравнение протеомов МВ, продуцируемых на средах с высоким и низким содержанием фосфора, поскольку дефицит фосфата индуцирует биосинтез внеклеточных РНКаз бациллами [21], получение которых имеет практическую значимость для терапевтических нужд. Принципиальное фундаментальное значение имеет также решение вопроса переноса генов и белков антибиотикорезистентности в составе МВ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Штамм и условия культивирования.** Штамм *B. pumilus* 3-19 (GenBank № HQ650161.1; ВКПМ В-9862) поддерживали на агаризованной среде Лурия–Бертани; для анализа везикул клетки высевали на глюкозо-пептонные среды (два варианта) состава (г/л): пептон – 20.0,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.3,  $\text{NaCl}$  – 3.0, глюкоза – 10.0 (рН 8.4–8.5). В состав среды с низким содержанием фосфата (LPM) входил пептон Семипалатинский (Россия), с высоким (НРМ) – пептон компании “Пан-Эко” (Россия). Штамм для получения МВ культивировали до достижения логарифмической фазы ( $OD_{600} > 2.0$ ).

**Определение концентрации фосфора в среде.** Содержание фосфора в среде определяли колориметрически по образованию фосфорно-молибденовой сини после добавления к 1 мл сре-

ды 0.8 мл раствора молибдата натрия (1.8%-ный в 2.5 Н серной кислоте) и 0.2 мл хлорида олова (0.4%-ный в концентрированной соляной кислоте) [22]. Колориметрирование проводили на КФК-2 при длине волны 670 нм. Содержание фосфора в среде определяли по формуле: фосфор (мкг/мл) =  $C \times P$ , где  $C$  – концентрация фосфата, найденная по калибровочной кривой,  $P$  – разведение. В качестве стандартного раствора использовали однозамещенный фосфат калия, содержащий 0.1 мг фосфора в 1 мл.

**Выделение и очистка внеклеточных везикул (МВ).** МВ выделяли согласно алгоритму, разработанному для грамположительных бактерий [9, 12]. Клетки осаждали центрифугированием при 6000 g в течение 20 мин, после чего супернатант фильтровали через стерильный ацетат-целлюлозный фильтр Minisart (“Sartorius Stedim Biotech GmbH,” Германия) с размером пор 100 нм. Стерильный фильтрат концентрировали в 20 раз с помощью концентратора Vivacell 100 (“Sartorius Stedim Biotech GmbH”). Везикулы осаждали ультрацентрифугированием (100 000 g, 2 ч, 8°C) с использованием ротора MLA-80 (“Beckman Coulter Optima™” MAX-E), осадок суспендировали в буфере (50 mM Трис-НСl рН 7.4, 150 mM  $\text{NaCl}$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Полученную суспензию везикул наслаивали на ступенчатый градиент 10–20–40% Optiprep (“Sigma”, США) и разделяли с помощью ультрацентрифугирования. Фракции везикул двукратно промывали в буфере (50 mM Трис-НСl, 150 mM  $\text{NaCl}$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$  рН 7.4) и снова осаждали центрифугированием. Полученный осадок ресуспендировали в буфере с добавлением 1 mM PMSF (“Fluka”, Германия). Отсутствие в исследуемом препарате везикул примесей клеток проверяли микроскопированием и высевом на агаризованную среду LB.

**Выделение и очистка ДНК.** Суммарную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с предварительной обработкой образцов ДНКазой I и протеиназой K. Количество выделенной ДНК оценивали с помощью флуориметра Qubit 2.0 (“Invitrogen”, США).

**Секвенирование ДНК.** ДНК для секвенирования на приборе Illumina Miseq фрагментировали, используя ультразвуковой фрагментатор Covaris S220 (“Covaris”, США), после чего проводили подготовку ДНК-библиотек с помощью коммерческого набора NEBNext Ultra II DNA Library Prep kit for Illumina (“NEB”, США). Для количественной оценки библиотек использовали флуориметр Qubit 2.0 (“Invitrogen”). Качество библиотек оценивали на чипах High Sensitivity, 2100 Bioanalyzer (“Agilent Technologies”, США).

Полученные риды картировали на сборку генома *B. pumilus* 3-19 (GenBank № HQ650161.1)

с помощью Bowtie2 и подсчитывали, используя программу featureCounts [23].

**Протеомный анализ везикул.** Протеомное профилирование МВ проводили с помощью LC/ESI-MS/MS. Белки МВ растворяли в буфере (25 мМ Трис-НСl pH 6.8, 5% глицерина, 0.05% бромфенолового синего, 1% SDS; 50 мМ ДТТ), центрифугировали (12 000 g, 10 мин) и отбирали супернатант, содержащий белки.

Белки разделяли с помощью одномерного электрофореза в 12%-ном полиакриламидом геле и окрашивали с помощью Кумасси G-250. Фракции белков вырезали из геля и отмывали в ddiH<sub>2</sub>O (15 мин) и смеси ацетонитрил: 200 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1 : 1) при 50°C в течение 30 мин. К гелю добавляли рабочий раствор трипсина (“Promega”, США). Трипсинолиз проводили при 37°C в течение ночи. Для экстракции пептидов из геля в каждую пробирку добавляли по 20 мкл 0.5%-ного раствора ТФУ и инкубировали в течение 10 мин на ультразвуковой бане. Продукты трипсинолиза очищали на колонках (Pierce C18 Tips, “Thermo Fisher”) согласно инструкции фирмы-изготовителя и высушивали на центрифужном испарителе (“Eppendorf”, Германия).

Белки МВ идентифицировали с помощью хромато-масс-спектрометрии. Спектры получали на приборе Maxis Impact (“Bruker”, Германия), укомплектованном системой для ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 Series (“Thermo Fisher Scientific”, США). Образцы растворяли в смеси метанола (1%), муравьиной кислоты (0.1%) и воды (98.9%) (об/об), наносили на колонку Acclaim PepMap RSLC (“Thermo Fisher Scientific”) и элюировали в течение 3 ч, увеличивая содержание смеси ацетонитрила (99.9%) и муравьиной кислоты (0.1%) с 2 до 60%.

Масс-спектры (MS1) получали при следующих параметрах: детекция молекулярных ионов в диапазоне 300–2000 m/z, время накопления сигнала 250 мс. Для получения спектров MS2 выбирали ионы с соотношением сигнал/шум не менее 400 и зарядом от 2 до 5. Детекцию ионов проводили в диапазоне 200–2000 m/z, время накопления сигнала 50 мс для каждого родительского иона. Точность измерения составляла 0.6 Да. Полученные MS/MS-спектры анализировали с использованием программы MASCOT (“Matrix Science, Inc.”). Идентификацию белка считали надежной при обнаружении минимум двух разных по аминокислотной последовательности пептидов со значением PEPscore  $\geq$  14.

**Атомно-силовая микроскопия.** Образцы клеточных культур, сконцентрированные центрифугированием (5000 g, 15 мин), наносили на предметное стекло и высушивали при ком-

натной температуре. Визуализацию бактерий проводили на воздухе при комнатной температуре и постоянной влажности в полуконтактном и контактном режимах на атомно-силовом микроскопе Solver P47H (“НТ-МДТ”, Россия) [24]. Использовали стандартные кремниевые кантилеверы, радиус кривизны острия которых не превышал 10 нм. Сканирование производили с разрешением 512  $\times$  512 пикселей.

**Трансмиссионная электронная микроскопия.** Образцы подготавливали стандартным методом [25]. Везикулы фиксировали в течение 16 ч в растворе 2.5%-го глутарового альдегида в 0.1 М фосфатном буфере pH 7.2–7.4 при 4°C, центрифугировали при 35 000 g (8°C, 70 мин), насыщали парами 1% OsO<sub>4</sub>, для обезвоживания промывали осадок спиртом и ацетоном. К осадку добавляли окись пропилена, инкубировали в течение 30 мин, далее осадок пропитывали эпоновой смолой. Блоки, полученные после полимеризации, нарезали и проводили трансмиссионную электронную микроскопию (микроскоп JEM-100 CX, Япония).

**Статистика и биоинформатика.** Для предсказания субклеточной локализации белков из МВ бактерий, выращенных на LPM и НРМ, использовали их аминокислотные последовательности и программное обеспечение PSORTb v3.0.3, доступное онлайн на <https://www.psort.org/psortb/> [26]. Последовательности использовали также для присвоения белкам номера К (КО) и для их функциональных аннотаций с применением программного обеспечения BlastKOALA на сайте KEGG (Киотская энциклопедия генов и геномов) (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>) [27]. Microsoft Excel 2019 из пакета Microsoft Office использовали для расчета кратности и статистической значимости изменений между белками МВ бактерий, выращенных на LPM и НРМ, с целью их последующего графического представления в соответствии с программным обеспечением VolcaNoseR (<https://huygens.science.uva.nl/VolcaNoseR/>) [28].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Образование и характеристика МВ*

В условиях фосфатного голодания в бактериях активируется синтез внеклеточных гуанил-предпочитающих РНКаз, что подтверждает участие этих ферментов в извлечении питательных веществ из труднодоступных субстратов [20]. Для выявления возможной секреции РНКаз в составе МВ мы выбрали два варианта сред культивирования бактерий: НРМ, в которой содержание фосфора составляло  $82 \pm 8$  мкг/мл, и LPM, содержащей  $20 \pm 2$  мкг/мл фосфо-

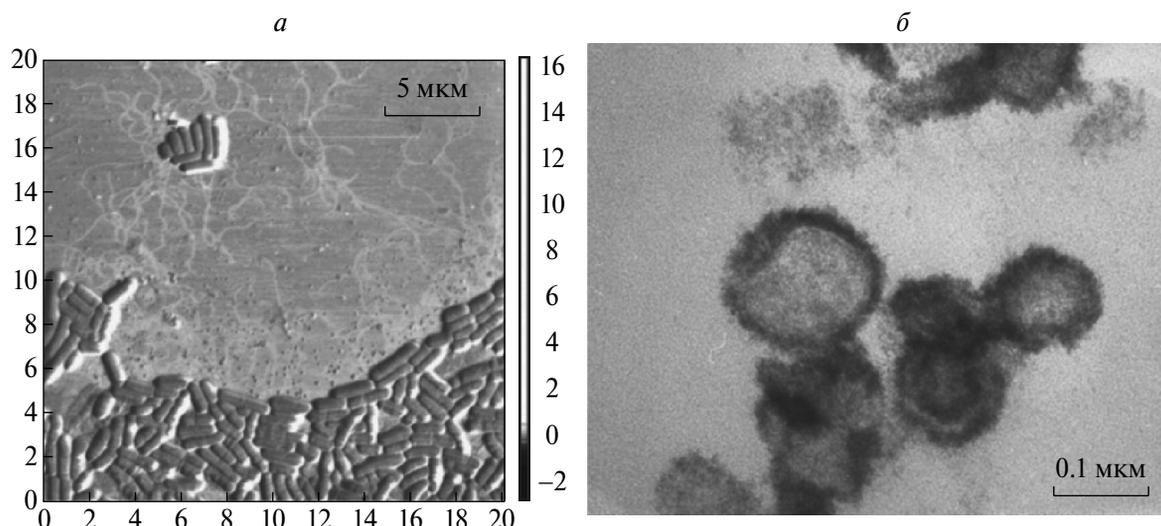


Рис. 1. Визуализация внеклеточных везикул *Bacillus pumilus* 3-19 с помощью атомно-силовой (а) и трансмиссионной электронной (б) микроскопии.

ра, учитывая, что на среде НРМ практически отсутствует секреция РНКаз. Образование МВ, представляющих собой сферические образования размером 80–120 нм, выявлено при росте бактерий на обеих средах (рис. 1).

Максимальное число генов, идентифицированных у *B. pumilus*, составляет 3679 (GenBank № CP054310.1). Нами секвенированы фрагменты ДНК бактерий, выращенных на среде LPM, и идентифицированы 3507 генов, из которых 686 кодируют гипотетические белки (табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp\\_Kurdy\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp_Kurdy_rus.pdf)). Некоторые различия в числе идентифицированных генов связаны с паттерном метилирования бактериальной ДНК, техническими особенностями процесса секвенирования и несовершенством сборки геномов, варьирующими в зависимости от условий культивирования [29]. Проведено предварительное исследование генома *B. pumilus*, направленное на изучение возможного попадания каких-либо генов в МВ. Ранее считали, что для МВ грамположительных бактерий характерно отсутствие генетического материала [30]. Хотя в последнее время зафиксировано присутствие ДНК в везикулах *Clostridium perfringens* [31], *S. mutans* [32], в МВ *B. subtilis* ДНК не обнаружена [12]. Во фракциях везикул *B. pumilus* 3-19 нам также не удалось обнаружить ДНК. Таким образом, МВ *B. pumilus* 3-19 представляют собой липопротеидные комплексы, не участвующие в переносе ДНК.

#### Функциональный анализ протеома МВ

Протеомный анализ везикул *B. pumilus*, выращенных на среде LPM, выявил в них 189 бел-

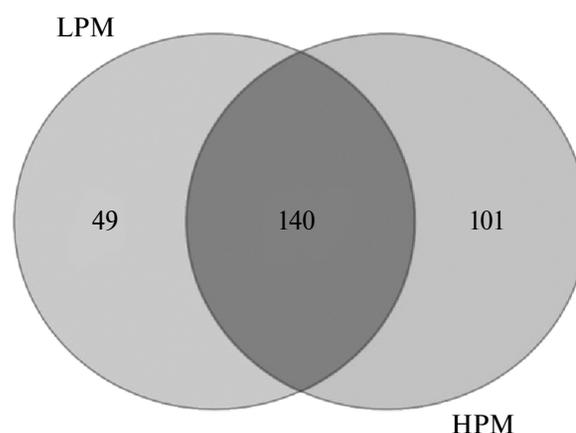


Рис. 2. Диаграмма Венна, показывающая количество белков в везикулах, полученных при культивировании *B. pumilus* 3-19 на средах LPM и НРМ.

ков. В протеоме везикул бактерий, выращенных на НРМ, обнаружен 241 белок. Как видно из диаграммы Венна, везикулы обоих типов содержат 140 общих белков (табл. S2, см. Дополнительные материалы).

Идентифицированные белки были распределены по функциональным группам с помощью BLAST-анализа. Установлено, что в везикулах из клеток, росших на среде LPM, увеличено количество белков, функции которых связаны с биосинтезом и метаболизмом липидов, аминокислот, гликанов, а также обработкой генетической информации и информации об окружающей среде. Доля белков, участвующих в энергетическом и углеводном обменах, напротив, понижена (рис. 3).

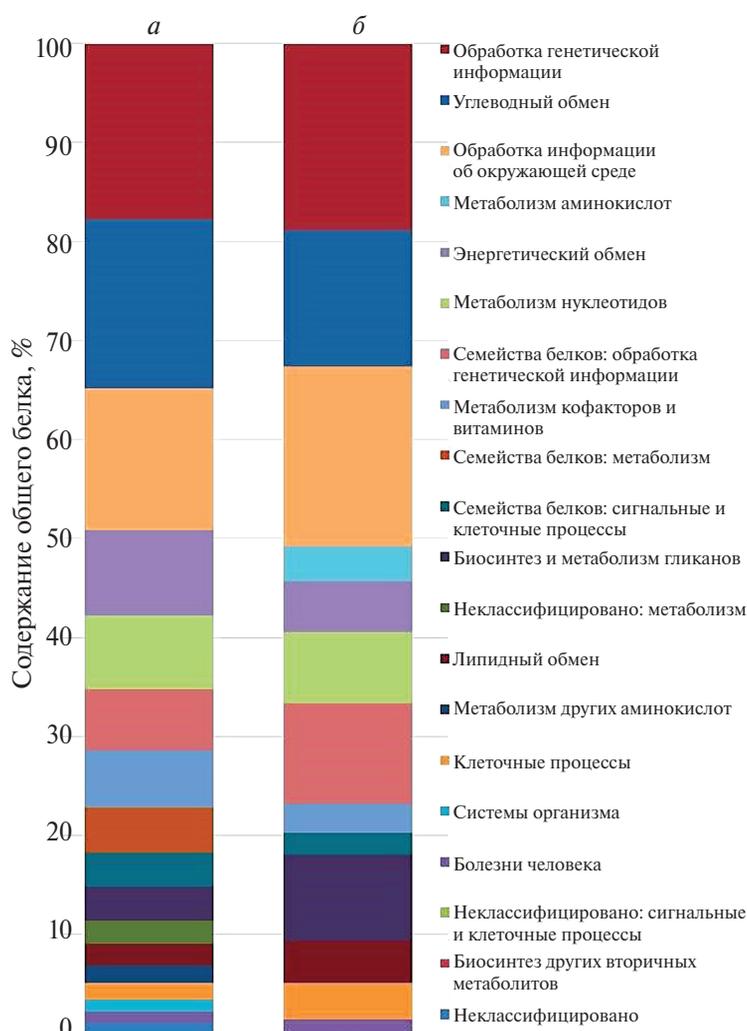


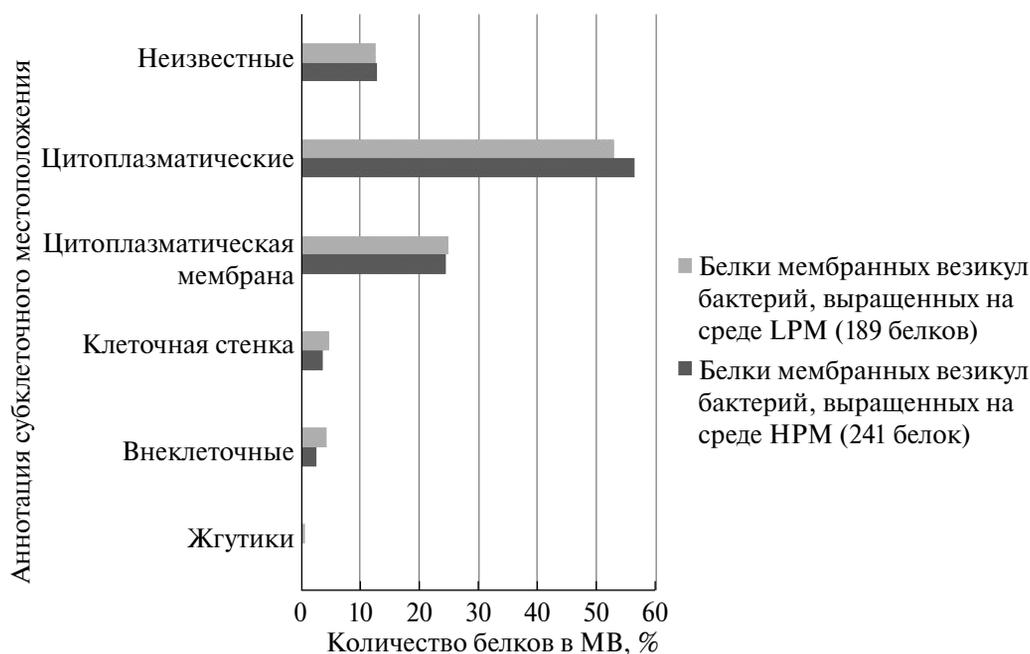
Рис. 3. Группы белков с известными функциями в мембранных везикулах *B. pumilus* 3-19, полученных при культивировании штамма на средах НРМ (а) и LPM (б) (программное обеспечение BlastKOALA).

Анализ локализации белков показал, что везикулы бактерий, выращенных на среде LPM, включают больше белков, аннотированных как внеклеточные и связанные с цитоплазматической мембраной по сравнению с везикулами с НРМ, которые содержат больше цитоплазматических белков (рис. 4).

В везикулах бактерий, культивируемых на среде LPM, обнаружена РНКаза (№ 34 в табл. S2, см. Дополнительные материалы). Как показал BLAST-анализ, аминокислотная последовательность этого белка полностью идентична последовательности внеклеточной РНКазы — биназы (GenBank № CAA37735.1). В везикулах бактерий, росших на среде НРМ, этот белок отсутствует. Таким образом, нами впервые показано, что на среде с низким содержанием фосфора *B. pumilus* 3-19 секретирует биназу в составе МВ (рис. 5а).

РНКаза J, основной фермент РНК-деградосомы, играет существенную роль в глобальном распаде мРНК. Этот фермент идентифицирован в составе МВ, продуцируемых клетками, растущими как на среде LPM, так и НРМ (рис. 5а).

Многие бациллы используют для ограниченного движения (скольжения) на влажных агаровых поверхностях нитевидные выросты — фимбрии (пили). Отдельные клетки в популяциях двигаются со скоростью от 76 до 116 мкм/с [33]. Переход от подвижности к формированию биопленки включает ингибирование транскрипции генов фимбрий; в отсутствие синтеза *de novo* фимбрии исчезают, что сопровождается стабилизацией биопленки [34]. Мы выращивали бактерии на жидкой среде, где биопленка не образовывалась, и смогли визуализировать фимбрии с помощью атомно-силовой микроскопии (рис. 1а).



**Рис. 4.** Локализация белков мембранных везикул *B. pumilus* 3-19, выращенных на средах LPM и НРМ (программное обеспечение PSORTb v3.0.3). За 100% принято количество белков в везикулах каждой фракции.

Белки фимбрий обнаружены нами в составе МВ *B. pumilus*. Поскольку эти белки присутствуют у подвижных жгутиковых бактерий, их относят к флагеллярным. В геноме *B. pumilus* 3-19 присутствуют 33 гена, кодирующих флагеллярные белки. Уровень белка FlgG повышен в МВ бактерий, выращенных на среде LPM, в то время как в везикулах бактерий, выращенных на НРМ, повышен уровень флагеллярного моторного белка MotA. Белки FlgK и флагеллин в МВ обоих типов представлены в равных количествах (рис. 5б).

У бактерий нитчатые структуры входят в состав внеклеточного матрикса, который окружает клетку и тем самым обеспечивает защиту от неблагоприятных условий окружающей среды. Подобные структуры, хорошо изученные у *Enterobacteriaceae* [35], состоят из так называемых функциональных амилоидов или, более корректно, амилоидоподобных белков, имеющих конструктивную функцию в отличие от амилоидных волокон, связанных с заболеваниями. Амилоидоподобные белки вовлечены в формирование биопленок, фимбрий, в адгезию клеток. Эти белки описаны и у грамположительных бактерий *Streptomyces coelicolor* и *B. subtilis* [36].

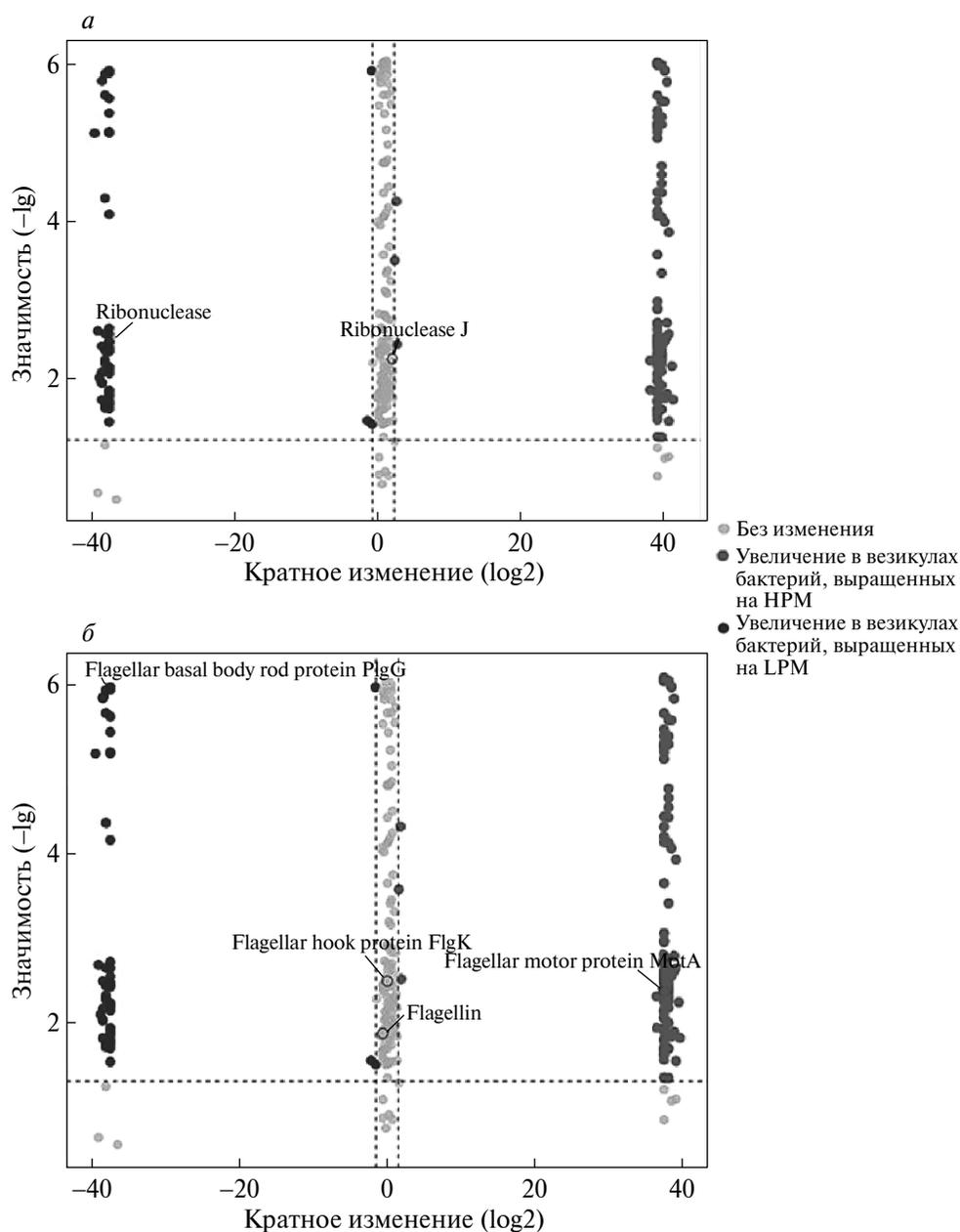
Амилоидоподобный белок TasA является основным матричным белком в биопленках *B. subtilis* [37, 38]. Нуклеотидные последовательности гена *TasA* идентифицированы у *B. subtilis*, *B. velezensis*, *S. pneumoniae*, а также у *B. pumilus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>

KC576815.1). Анализ генома *B. pumilus* 3-19 выявил в нем ген амилоидоподобного белка TapA (№ 2767, amyloid fiber anchoring/assembly protein, табл. S1, см. Дополнительные материалы), который служит праймером для олигомеризации TasA. Однако в состав везикул этот белок не входит.

Таким образом, в настоящей работе впервые зафиксировано образование внеклеточных МВ *B. pumilus* 3-19 и определен их состав. Установлено, что МВ не содержат генетического материала и различаются спектром белков, который зависит от содержания фосфата в среде культивирования штамма. МВ несут 140 общих белков; 49 уникальных белков идентифицировано в везикулах клеток, росших на среде LPM, и 101 — на среде НРМ. В везикулах обнаружены флагеллярные белки и не найдены белки антибиотикорезистентности и амилоидоподобные белки, гены которых присутствуют в клетках *B. pumilus* 3-19. Оба типа везикул содержат РНКазу J, основной фермент РНК-деградосомы. Секретируемая РНКаза — биназа, синтез которой индуцируется дефицитом фосфата, входит в состав МВ клеток, культивируемых на среде LPM, но не НРМ.

Авторы благодарят директора Междисциплинарного центра протеомных исследований КФУ Т.В. Григорьеву за помощь в работе.

Работа выполнена в рамках программы «Приоритет-2030» и поддержана грантом Российского научного фонда (№ 22-24-00036).



**Рис. 5.** Сравнение содержания белков (*a* – РНКаз, *б* – флагеллярных) в МВ *V. pumilus* 3-19, культивируемых на средах LPM и НРМ (программное обеспечение VolcaNoseR).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Toyofuku M., Nomura N., Eberl L. (2019) Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 13–24.
2. Vitse J., Devreese B. (2020) The contribution of membrane vesicles to bacterial pathogenicity in cystic fibrosis infections and healthcare associated pneumonia. *Front. Microbiol.* **11**, 630.
3. Cao Y., Lin H. (2021) Characterization and function of membrane vesicles in Gram-positive bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**(5), 1795–1801.
4. Stentz R., Jones E., Juodeikis R., Wegmann U., Guirro M., Goldson A.J., Brion A., Booth C., Sudhakar P., Brown I.R., Korcsmáros T., Carding S.R. (2022) The proteome of extracellular vesicles produced by the human gut bacteria *Bacteroides thetaio-*

- taomicron in vivo* is influenced by environmental and host-derived factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **88**(16), e0053322.
5. Liu J., Hsieh C.L., Gelincik O., Devolder B., Sei S., Zhang S., Lipkin S.M., Chang Y.F. (2019) Proteomic characterization of outer membrane vesicles from gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum*. *J. Proteomics.* **195**, 125–137.
  6. Zhang K., Chu P., Song S., Yang D., Bian Z., Li Y., Gou H., Jiang Z., Cai R., Li C. (2021) Proteome analysis of outer membrane vesicles from a highly virulent strain of *Haemophilus parasuis*. *Front. Vet. Sci.* **8**, 756764.
  7. Terán L.C., Distefano M., Bellich B., Petrosino S., Bertoncin P., Cescutti P., Sblattero D. (2020) Proteomic studies of the biofilm matrix including outer membrane vesicles of *Burkholderia multivorans* C1576, a strain of clinical importance for cystic fibrosis. *Microorganisms.* **8**(11), 1826.
  8. Zanella I., König E. Tomasi M., Gagliardi A., Frattini L., Fantappiè L., Irene C., Zerbini F., Caproni E., Isaac S.J., Grigolato M., Corbellari R., Valensin S., Ferlenghi I., Giusti F., Bini L., Ashhab Y., Grandi A., Grandi G. (2021) Proteome-minimized outer membrane vesicles from *Escherichia coli* as a generalized vaccine platform. *J. Extracell. Vesicles.* **10**(4), e12066.
  9. Lee E.Y., Choi D.Y., Kim D.K. (2009) Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics.* **9**(24), 5425–5436.
  10. Bitto N.J., Cheng L., Johnston E.L., Pathirana R., Phan T.K., Poon I.K.H., O'Brien-Simpson N.M., Hill A.F., Stinear T.P., Kaparakis-Liaskos M. (2021) *Staphylococcus aureus* membrane vesicles contain immunostimulatory DNA, RNA and peptidoglycan that activate innate immune receptors and induce autophagy. *J. Extracell. Vesicles.* **10**(6), e12080.
  11. Olaya-Abril A., Prados-Rosales R., McConnell M.J., Martín-Peña R., González-Reyes J.A., Jiménez-Munguía I., Gómez-Gascón L., Fernández J., Luque-García J.L., García-Lidón C., Estévez H., Pachón J., Obando I., Casadevall A., Pirofski L.A., Rodríguez-Ortega M.J. (2014) Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Proteomics.* **106**, 46–60.
  12. Kim Y., Edwards N., Fenselau C. (2016) Extracellular vesicle proteomes reflect developmental phases of *Bacillus subtilis*. *Clin. Proteomics.* **13**, 6.
  13. Alkandari S.A., Bhardwaj R.G., Ellepola A., Karched M. (2020) Proteomics of extracellular vesicles produced by *Granulicatella adiacens*, which causes infective endocarditis. *PLoS One.* **15**(11), e0227657.
  14. Ilinskaya O.N., Mahmud R.S. (2014) Ribonucleases as antiviral agents. *Mol. Biol.* **48**(5), 615–623.
  15. Shah Mahmud R., Efimova M.A., Ulyanova V., Raviarov R.K., Shuralev E.A., Kolpakov A., Ilinskaya O. (2020) *Bacillus pumilus* ribonuclease rescues mice infected by double-stranded RNA-containing reovirus serotype 1. *Virus Res.* **286**, 198086.
  16. Ulyanova V., Shah Mahmud R., Laikov A., Dudkina E., Markelova M., Mostafa A., Pleschka S., Ilinskaya O. (2020) Anti-influenza activity of the ribonuclease binase: cellular targets detected by quantitative proteomics. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(21), 8294.
  17. Garipov A.R., Nesmelov A.A., Cabrera-Fuentes H.A., Ilinskaya O.N. (2014) *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces apoptosis in human ovarian cancer cells. *Toxicol.* **92**, 54–59.
  18. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., Ilinskaya O.N., Tchurikov N.A., Makarov A.A. (2013) Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells. *Biochimie.* **95**(6), 1344–1349.
  19. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. (2016) Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim. Biophys. Acta.* **1863**(7 Pt A), 1559–1567.
  20. Faizullin D., Valiullina Y., Salnikov V., Zelenikhin P., Zuev Y., Ilinskaya O. (2023) Fibrin-rhamnogalacturonan i composite gel for therapeutic enzyme delivery to intestinal tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(2), 926.
  21. Харитоновна М.А., Колпаков А.И., Куприянова-Ашина Ф.Г. (2018) Интенсификация продукции секретлируемой рибонуклеазы Bsn *Bacillus subtilis* в условиях солевого стресса. *Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол. им. Овчинникова.* **14**(2), 42–47.
  22. Аринушкина Е.В. (1970) *Руководство по химическому анализу почв.* Москва: Изд-во МГУ. 218 с.
  23. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* **30**(7), 923–930.
  24. Konovalova O.A., Yakovleva G. Yu., Steryakov O.V., Trushin M.V. (2013) Scanning probe microscopy in the study of morphometric changes and physical parameters of *Escherichia coli* bacteria under the action of 2,4,6-trinitrotoluene. *W. Appl. Sci. J.* **23**(4), 507–509.
  25. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Efimova I.R., Shaymardanova G.F., Medvedeva E.S., Trushin M.V. (2011) Extracellular vesicles derived from *Acholeplasma laidlawii* PG8. *Sci. World J.* **11**, 1120–1130.
  26. Yu N.Y., Wagner J.R., Laird M.R., Melli G., Rey S., Lo R., Dao P., Sahinalp S.C., Ester M., Foster L.J., Brinkman F.S.L. (2010) PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics.* **26**(13), 1608–1615.
  27. Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* **428**, 726–731.
  28. Goedhart J., Luijsterburg M.S. (2020) VolcanoR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Sci. Rep.* **10**, 20560.

29. Adhikari S., Curtis P.D. (2016) DNA methyltransferases and epigenetic regulation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**(5), 575–591.
30. Dorward D.W., Garon C.F. (1990) DNA is packaged within membrane-derived vesicles of gram-negative but not gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6), 1960–1962.
31. Jiang Y., Kong Q., Roland K.L., Curtiss R. (2014) Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**(3–4), 431–443.
32. Liao S., Klein M.I., Heim K.P., Fan Y., Bitoun J.P., Ahn S.J., Burne R.A., Koo H., Brady L.J., Wen Z.T. (2014) *Streptococcus mutans* extracellular DNA is up-regulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J. Bacteriol.* **196**(13), 2355–2366.
33. Mendelson N.H., Bourque A., Wilkening K., Anderson K.R., Watkins J.C. (1999) Organized cell swimming motions in *Bacillus subtilis* colonies: patterns of short-lived whirls and jets. *J. Bacteriol.* **181**(2), 600–609.
34. Guttenplan S.B., Kearns D.B. (2013) Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**(6), 849–871.
35. Barnhart M.M., Chapman M.R. (2006) Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 131–147.
36. Dragoš A., Kovács Á.T., Claessen D. (2017) The role of functional amyloids in multicellular growth and development of gram-positive bacteria. *Biomolecules.* **7**(3), 60.
37. Malishev R., Abbasi R., Jelinek R., Chai L. (2018) Bacterial model membranes reshape fibrillation of a functional amyloid protein. *Biochemistry.* **57**(35), 5230–5238.
38. Böhning J., Ghrayeb M., Pedebos C., Abbas D.K., Khalid S., Chai L., Bharat T.A.M. (2022) Donor-strand exchange drives assembly of the Tasa scaffold in *Bacillus subtilis* biofilms. *Nat. Commun.* **13**(1), 7082.

## Proteome of Extracellular Membrane Vesicles from *Bacillus pumilus* 3-19

W. Kurdy<sup>1</sup>, P. V. Zelenikhin<sup>1</sup>, G. Yu. Yakovleva<sup>1</sup>, M. N. Sinyagina<sup>1</sup>, A. I. Kolpakov<sup>1</sup>,  
and O. N. Ilinskaya<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Kazan (Volga-Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

\*e-mail: Ilinskaya\_kfu@mail.ru

Production of extracellular membrane vesicles plays an important role in communication in bacterial populations and in bacteria - host interaction. Vesicles as carriers of various regulatory and signaling molecules may be potentially used as disease biomarkers and promising therapeutic agents, including vaccine preparations. The composition of membrane vesicles has been deciphered for a limited number of Gram-negative and Gram-positive bacteria. In this work, for the first time, extracellular membrane vesicles of a streptomycin-resistant strain *Bacillus pumilus* 3-19, a producer of extracellular guanyl-preferring ribonuclease binase, are isolated, visualized, and characterized by their genome and proteome composition. It has been established that there is no genetic material in the vesicles, and the spectrum of proteins differs depending on the phosphate content in the culture medium of the strain. Vesicles from a phosphate-deficient medium carry 49 unique proteins in comparison with 101 from a medium with the high phosphate content. The two types of vesicles had 140 mutual proteins. Flagellar proteins, RNase J – the main enzyme of RNA degradosomes, phosphatases, peptidases, iron transporters, signal peptides, were identified in vesicles. Antibiotic resistance proteins and amyloid-like proteins whose genes are present in *B. pumilus* 3-19 cells are absent. Phosphate deficiency-induced binase was found only in vesicles from a phosphate-deficient medium.

**Keywords:** extracellular membrane vesicles, *Bacillus pumilus*, genome, proteome, RNase, binase, flagellar proteins, amyloid-like proteins