

## Изучение протективного внеклеточного протеома *Staphylococcus aureus* № 6

И.М. Грубер<sup>1</sup> (igruber\_instmech@mail.ru), Ф.В. Доненко<sup>2</sup>, Е.А. Асташкина<sup>1</sup>,  
В.О. Шендер<sup>3</sup>, Р.К. Зиганшин<sup>3</sup>, М.В. Киселевский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва

<sup>2</sup>ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Москва

### Резюме

В последние годы повсеместно наблюдается увеличение распространения инфекций как внебольничных (ВИ), так и связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), причиной которых является *S. aureus*. Ранее с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим (LC-MS) анализом был исследован спектр белков *S. aureus* № 6 с молекулярной массой 30 – 50 кДа, секретируемых в культуральную среду в конце экспоненциальной фазы роста, обладающих протективной активностью. Из выявленных пептидов было идентифицировано 11 белков, и были получены предварительные результаты относительно протективной активности выделенного белоксодержащего соединения (БСС), обозначенного как «исходное». При его фракционировании с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Sepharose была получена протективная фракция – II БСС, подкожная иммунизация которой при генерализованной инфекции мышей BALB/c, развивающейся в результате ретро-орбитального введения сублетальной дозы *S. aureus*, приводит к снижению высеваемости из почки и формированию абсцессов почки, по сравнению с контролем.

Цель работы: изучение протективного внеклеточного протеома II БСС *S. aureus* № 6.

Материалы и методы. LC-MS анализ полученных данных был проведен путем сравнения выявленного масс-спектра белков II БСС с результатами протеомного изучения вирулентного штамма *S. aureus* Newman, широко используемого в исследованиях. С применением различных баз данных было достоверно выявлено более 100 кластеров взаимодействующих белков.

Результаты. При анализе основное внимание уделено 46-ти идентифицированным белкам, участвующим в различных биологических процессах. Так, наибольшую группу (19 белков) составляют ферменты углеводного обмена, 8 из которых участвуют в ключевых этапах гликолиза; 6 белков относятся к факторам патогенности (в том числе хлопьеобразующие факторы А и В, гаптоглобинсвязывающий поверхностный белок) и 4 – к стрессовым белкам. Остальные 17 белков составляют обширную группу белков, участвующих в различных метаболических и биосинтетических процессах.

Заключение. Полученные результаты подтвердили данные других исследователей об идентификации большого количества секретированных *S. aureus* белков и об их слабом совпадении с выделенными из клинических изолятов. Это свидетельствует о справедливости положения о пластичности генома *S. aureus*, влияющего на гетерогенность профиля экзопротеома, что в большой степени определяет сложности в разработке эффективных противостафилококковых вакцин.

**Ключевые слова:** протеом, жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрическим анализом, секретируемые белоксодержащие соединения, углеводный обмен, факторы патогенности

### The Study of Protective Extracellular Proteome *Staphylococcus aureus* № 6

I.M. Gruber<sup>1</sup> (igruber\_instmech@mail.ru), F.V. Donenko<sup>2</sup>, E.A. Astashkina<sup>1</sup>, V.O. Shender<sup>3</sup>, R.K. Ziganshin<sup>3</sup>, M.V. Kiselevsky<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Research Institution «I.I. Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccine and Sera», Moscow

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Research Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow.

<sup>3</sup>Federal State Budgetary Research Shemyakin–Ovchinnikov Institution for Bioorganic Chemistry, Moscow

### Abstract

In recent years, there is a persistent increase in the spread of community-acquired infections and medical care associated infections, the cause of which is *S. aureus*. Previously using liquid chromatography in combination with mass spectrometry (LC-MS) analysis, spectrum of having protective activity *S. aureus* № 6 proteins with a molecular weight of 30 – 50 kDa, secreted into the culture medium at the end of the exponential growth phase, was investigated. 11 proteins were identified from indicated peptides and preliminary results of the protective activity of the secreted protein-based substances (SPS), marked as «initial», were obtained. While its fractionation with ion exchange chromatography on DEAE-Sepharose, the protective fraction – II SPS – was obtained. Its hypodermic immunization leads to reduction of kidney inoculation, and to kidney abscess formation, compared to the control, during the generalized infection of mice BALB/c, developing as a result of retro-orbital injection of sublethal dose *S. aureus*.

*Aim.* investigation the protective extracellular proteome of SPS S. aureus № 6.

*Material and methods.* LC-MS analysis of the received data was carried out by comparing the detected mass-spectrum protein of SPS with the results of proteomic study of the virulent strain of S. aureus Newman widely used in researches. More than 100 interacting protein clusters were identified for certain using various databases.

*Results.* During analysis main attention was paid to 46 identified proteins involved in various biological processes. Thus, the largest group (19 proteins) is composed of carbohydrate metabolism enzymes, eight of which are involved in key stages of glycolysis; 6 proteins are related to pathogenicity factors (including clumping factors A and B, gaptoglobin-adhesive surface protein) and 4 proteins are related to stress ones. The remaining 17 proteins represent a large group of proteins involved in various metabolic and biosynthetic processes.

*Conclusion.* The received results confirmed the data of other researchers on the identification of a large number of secreted proteins of S. aureus and on their low coincidence with secreted from clinical isolates. This demonstrates the validity of the postulate of the plasticity of the S. aureus genome affecting the exoproteome profile that largely determines the difficulties in creation of effective anti-staphylococcal vaccines.

**Key words:** proteome, liquid chromatography in combination with mass spectrometry, secreted protein-based substances, carbohydrate metabolism, pathogenicity factors

## Введение

*Staphylococcus aureus* – оппортунистический бактериальный патоген, часто являющийся причиной как внебольничных инфекций (ВИ), так и связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), включающих бактериемию, эндокардит, остеомиелит, септический артрит, пневмонию и другие заболевания [1 – 4]. В последние годы повсеместно наблюдается увеличение распространения заболеваний стафилококковой этиологии [5, 6].

При геномном секвенировании двух метициллин-резистентных (MRSA) штаммов *S. aureus*, вызывающих ВИ (клонов MW2, или USA400, и пандемического USA300), установлено, что около 20% состава генома обусловлено горизонтальным переносом многочисленных мобильных генетических элементов, включающих профаги и острова патогенности (содержащие специализированные факторы патогенности, такие как экзотоксины и экзопротеины, способствующие разрушению защиты хозяина), которые отсутствуют у традиционных MRSA-штаммов COL, N315 и MRSA252, вызывающих ИСМП [7, 8]. После проведения сравнительного филогенетического анализа авторы установили клональную взаимосвязь штаммов *S. aureus* Newman, а также COL, NCTC8325, USA300 и большие эволюционные различия с рядом штаммов, вызывающих ИСМП, при этом заключили, что профаги и острова патогенности играют основную роль в вирулентности и эволюции *S. aureus*. Протеомный анализ изолятов *S. aureus* (P – MSSA и USA300 – MRSA) показал, что они продуцируют поверхностные секретлируемые белки IsaA, LytM, Nuc, пропептид Atl (pro-Atl) и 4 фенол-растворимых модулина (PSM), причем PSM способствуют распространению *S. aureus* на влажной поверхности, в частности колонизации катетеров [9, 10]. В связи с этим на мышинных моделях бактериемии и кожной инфекции было изучено протективное в отношении *S. aureus* действие 8 указанных выше белков [10]. При этом у иммунизированных мышей по сравнению с контролем (неиммунизированные мыши)

был установлен высокий уровень IgG к антигенам, однако не отмечено ни снижения высеваемости (из крови, легких, селезенки, печени и почек на модели бактериемии), ни летальности, не выявлено редукции кожной инфекции (при внутрикожном заражении). Эти результаты, по мнению авторов, свидетельствуют об антигенной активности изученных белков, как на мышинной модели, так и на людях (что было показано в отношении некоторых приведенных белков), при отсутствии протективного действия рассматриваемых белков на мышинной модели.

Ранее были представлены результаты определения спектра белков, которые синтезирует и выделяет в культуральную среду *S. aureus* № 6 на ранней стадии роста – в конце экспоненциальной фазы [11]. С помощью жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим (LC-MS) анализом был исследован спектр секретированных белков с молекулярной массой преимущественно 30 – 50 кДа, для которых были получены предварительные данные о протективной активности. В этом исследовании анализ полученных данных был проведен путем сравнения выявленного масс-спектра белков с результатами протеомного изучения, осуществленного в Европейском институте биоинформатики с помощью программы Mascot (Matrix Science, Бичвуд, США) с использованием базы данных белковых последовательностей MSDB (<http://www.proteomics.leeds.ac.uk/bioinf/msdb.html>; обновление от 31 августа 2006 года; Proteomics Department at the Hammersmith Campus of Imperial College, Лондон Великобритания). В ходе исследования было выявлено 208 пептидов, из них было идентифицировано 11 белков; остальные компоненты, обнаруженные при электрофорезе в геле, предположительно являлись полисахаридами или пептидогликанами, как ранее отмечено в секретлируемых белковых препаратах *K. pneumoniae* [12]. С помощью программы PSORTb, базы знаний UniProt (UniProt Knowledgebase) и базы данных Европейского института биоинформатики было уста-

новлено цитоплазматическое происхождение 7-ми из 11-ти идентифицированных белков. Учитывая изоэлектрические точки идентифицированных белков (два белка находятся в щелочном диапазоне, остальные – в области кислых значений pH), было высказано предположение об образовании комплексов, имеющих нейтральный заряд, что является одним из важных условий молекулярного транспорта белкового комплекса через клеточную мембрану. Таким образом, в исследовании было выявлено минимальное количество белков, которые синтезирует бактерия при выходе из фазы покоя: это 2 белка – экспортера, 5 – ферменты углеводного обмена, 2 – участвуют в биосинтезе жирных кислот и декарбоксилации глицина и супероксиддисмутаза – фермент, способствующий течению окислительно-восстановительных реакций. Успешная работа этих ферментов обеспечивает бактерию всем необходимым для дальнейшего развития, а нарушение их работы может быть сигналом о плохих внешних условиях, что может блокировать развитие популяции. Следует отметить, что изученное белоксодержащее соединение (БСС) обозначено как «исходное», поскольку оно является основой для фракционирования. В последующих исследованиях установлено, что одним из наиболее протективных БСС является фракция, полученная при ионообменной хроматографии на DEAE-Sepharose и обозначенная как II БСС [13]. Данное БСС представляет особый интерес, поскольку двукратная подкожная иммунизация при генерализованной инфекции, развивающейся в результате ретроорбитального введения сублетальной дозы *S. aureus*, приводит к снижению по сравнению с контролем высеваемости из почки и формирования абсцессов почки.

**Цель работы** – изучение протективного внеклеточного протеома II БСС *S. aureus* № 6.

#### Материалы и методы

Белоксодержащие соединения штамма *Staphylococcus aureus* № 6 (из коллекции ГИСК № 201200) получали из фильтрата культуральной жидкости после выращивания в жидкой синтетической питательной среде с добавлением экстракта дрожжевого растворимого («Биотехновация», Москва) и глюкозы до окончания фазы экспоненциального роста по описанной ранее технологии [12]. II БСС получали на колонке с ионообменным носителем DEAE-Sepharose, предварительно уравновешенной 50 мМ цитратным буфером, и элюировали 0,1 М цитратным буфером. Фракционирование по молекулярной массе проводили с помощью ультрафильтрации на двух фильтрах с порогом отсека белка ниже 30 кДа и выше 100 кДа [13].

Жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрическим (LC-MS) анализом проводили в соответствии с [14]. Анализ полученных данных был проведен путем сравнения выявленного масс-спектра белков с результатами проте-

омного изучения вирулентного штамма *S. aureus* Newman, выделенного от инфицированного человека и широко используемого в исследованиях [15].

Для определения функциональной аннотации идентифицированных белков были использованы онлайн-сервис STRING-db [<http://string-db.org>] и базы данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), GO (Gene Ontology), PFAM (Protein Families) и INTERPRO (Integrated Resource Of Protein Families, Domains And Functional Sites). Достоверно ( $p < 0,05$ ) выявлено более 100 кластеров взаимодействующих белков.

#### Результаты и обсуждение

Из всех обнаруженных белков особое внимание было уделено белкам с молекулярной массой 30 – 90 кДа. В некоторых случаях были также учтены белки (5 белков, отмеченных звездочкой в табл.), идентифицированные при первом протеомном анализе «исходного» БСС (фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза 1 класса, фосфоглицерат киназа, триозофосфат изомеразы, супероксид дисмутаза, белок H системы расщепления глицина) [11] или относящиеся к факторам вирулентности и стрессовым белкам, которые по своему участию в биологических процессах были разделены на 4 группы (см. табл.):

I группа – наиболее многочисленная (19 белков), как и в первом исследовании [11], составляют ферменты углеводного обмена с цитоплазматической локализацией (13 белков; один белок № 9 – фосфопируват гидратаза – отмечается также внеклеточно); для 6 белков локализация не установлена. Из белков этой группы 9 (№ 1 – 9) участвуют в гликолизе/глюконеогенезе, в метаболизме и катаболизме углеводов; 2 фермента (№ 10 – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа А и № 11 – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа В) – в гликолизе, в метаболизме углеводов; № 12 – глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназа – в метаболизме углеводов, в окислительно-восстановительном процессе; № 13 – пируваткарбоксилаза – в глюконеогенезе; № 14 – 6-фосфоглюконат дегидрогеназа – в пентозофосфатном цикле, в метаболизме и катаболизме углеводов, 2 фермента (№ 15 (Е2) – дигидролипиацетил трансфераза и № 16 (Е3) – дигидролипиамида дегидрогеназа) – в гликолизе, относясь к ферментам пируват дегидрогеназного комплекса; № 17 – D-аланин-полифосфоритол-лигаза и № 18 – рибокиназа – участвуют соответственно в биосинтезе липотейхоевой кислоты и в метаболизме пентозы на этапе фосфорилирования. Следует подчеркнуть, что 8 из приведенных ферментов (№ 7, 10, 11, 4, 8, 9, 5, 6) участвуют в ключевых этапах гликолиза: в изомеризации производного глюкозы и в дальнейшем фосфорилировании с возникновением триозофосфата, который окисляется до 3-фосфоглицериновой кислоты с последующим переходом через 2-фосфоглицерат в пируват, кото-

**Таблица.**

**Анализ внеклеточных белков, идентифицированных во II БСС с помощью жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии в конце фазы экспоненциального роста *S. aureus* № 6**

Группа белков	№ п/п	Номер доступа	Обозначение гена	Название белка	ММ, кДа	pI	Участие в биологическом процессе	Локализация
Ферменты углеводного обмена	1	A6QK93	<i>fda</i>	Фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза 1 класса* fructose-bisphosphate aldolase class 1	33.034	4.92	гликолиз/ глюконеогенез, метаболизм (МУ) и катаболизм углеводов (КУ)	н/и
	2	A6QIW9	<i>fbaA</i>	Фруктозо-бисфосфат альдолаза fructose-bisphosphate aldolase	30.933	5.01		н/и
	3	A6QFH3	<i>pgi</i>	Глюкозо-6-фосфат изомераза glucose-6-phosphate isomerase	49.835	4.83		ЦП
	4	A6QF82	<i>pgk</i>	Фосфоглицерат киназа* phosphoglycerate kinase	42.633	5.17		ЦП
	5	A6QDL6	<i>ldh1</i>	L-лактат дегидрогеназа 1 L-lactate dehydrogenase 1	34.678	4.95		ЦП
	6	A6QK89	<i>ldh2</i>	L-лактат дегидрогеназа 2 L-lactate dehydrogenase 2	34.457	4.78		ЦП
	7	A6QF83	<i>tpiA</i>	Триозофосфат изомераза* triosephosphate isomerase	27.419	4.80		ЦП
	8	A6QF84	<i>gpm</i>	Фосфоглицерат мутаза phosphoglycerate mutase	56.447	4,74		ЦП
	9	A6QF85	<i>eno</i>	Фосфопируват гидратаза phosphopyruvate hydratase	47.146	4.55		ЦП, ВК
	10	A6QF81	<i>gapA</i>	Глицеральдегид-3фосфат дегидрогеназа А glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseA	36.374	4.89	гликолиз, в МУ и КУ	н/и
	11	A6QNM0	<i>gapB</i>	Глицеральдегид-3фосфат дегидрогеназа В glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	37.130	5.95		н/и
	12	A6QH52	<i>zwf</i>	Глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназа glucose-6-phosphate-1- dehydrogenase	57.045	5.31	МУ, окислительно- восстановительный процесс	ЦП
	13	A6QFW9	<i>pycA</i>	Пируваткарбоксилаза Pyruvate carboxylase	129.413	5.18	глюконеогенез, биосинтез углеводов	ЦП
	14	A6QH57	<i>gnd</i>	6-фосфоглюконат дегидрогеназа 6-phosphogluconate dehydrogenase	51.944	5.00	пентозофосфатный цикл, МУ и КУ	н/и
	15	A6QFV1	E 25 ( <i>pdhC</i> )	Дигидролипоамид-ацетил- трансфераза (E2) dihydrolipoamide acetyltransferase	46.412	4.90	гликолиз, ферменты пируват- дегидрогеназного комплекса	н/и
	16	A6QH64	<i>lpdA</i>	Дигидролипоамид дегидрогеназа (E 3) dihydrolipoyl dehydrogenase	51.311	5.30		ЦП
	17	A6QFE3	<i>dltA</i>	D-аланин-полифосфорибитол лигаза D-alanine-polyphosphoribitol ligase subunit 1	54.868	4.83	биосинтез липотейхоевой кислоты	ЦП
	18	A6QDP2	<i>rbsK</i>	Рибокиназа Ribokinase	100,884	4,85	метаболизм пентозы, фосфорилирование	ЦП
	19	A6QFU0	<i>ptsI</i>	Фосфоенолпируват- протеинфосфатаза phosphoenolpyruvate-protein phosphatase	63,353	4,66	компонент фос- фотрансферазной транспортной систе- мы, катализирующей транслокацию фос- форильной группы	ЦП

Группа белков	№ п/п	Номер доступа	Обозначение гена	Название белка	ММ, кДа	pI	Участие в биологическом процессе	Локализация
Факторы патогенности	20	Q53653	<i>clfA</i>	Хлопьеобразующий фактор А clumping factor A	97,002	3,61	индукция образования бактериальных скоплений, прикрепление бактерий особенно к цепи фибриногена	КС, ВК
	21	O86476	<i>clfB</i>	Хлопьеобразующий фактор В clumping factor B	97,205	3,84		КС, ВК
	22	A6QG32	<i>isdC</i>	Железорегулируемый поверхностный белок iron-regulated surface determinant protein	24,840	8,94	железорегулируемый белок, взаимодействует с гемом, влияет на образование гемоглобина	КС, ВК
	23	O86487	<i>sdrC</i>	Серин-аспартатный белок С serine-aspartate repeat-containing protein C	102,854	4,20	клеточная адгезия, связывание костных сиалопротеинов, способствуют взаимодействию с внеклеточным матриксом	КС, ВК
	24	O86489	<i>sdrE</i>	Серин-аспартатный белок Е serine-aspartate repeat-containing protein E	126,474	4,22		КС, ВК
	25	A6QHR4	<i>sas1</i> (NWMN_1624)	Гаптоглобинсвязывающий поверхностный белок haptoglobin-binding surface anchored protein	100,874	5,05	гаптоглобинсвязывающий белок	КС, ВК
Стрессовые белки	26	A6QEK3	<i>hchA</i>	Молекулярный шаперон molecular chaperone Hsp31 and glyoxalase 3	32,272	4,90	терморегулируемый белок, шаперон	ЦП
	27	A6QH96	<i>sodA</i>	Супероксиддисмутаза* superoxide dismutase	22,697	5,08	окислительно-восстановительный процесс	ЦП
	28	A6QF72	<i>trxB</i>	Тиоредоксинредуктаза thioredoxin reductase	33,711	5,21		ЦП
	29	A6QF76	<i>clpP</i>	АТФ-зависимая протеиназа ATP-dependent Clp protease	21,558	5,13	расщепление белков (важная роль в деградации неправильно упакованных белков)	ЦП
Метаболизм, процессы биосинтеза	30	A6QFF2	<i>ampA</i> ( <i>pepA</i> )	Аминопептидаза (белок семейства) aminopeptidase	54,269	5,53	расщепление белков, деление клетки (метаболизм глутатиона, гидролазная активность)	ЦП
	31	A6QKC3	<i>arcB</i>	Орнитин карбамилтрансфераза В ornithine carbamoyltransferase B	37,855	5,15	метаболизм карбоновой кислоты и кетона	ЦП
	32	A6QG68	<i>argF</i>	Орнитин карбамилтрансфераза F ornithine carbamoyltransferase F	37,725	5,06	биосинтез аминокислот (аргинина, глутамина)	ЦП
	33	A6QER9	<i>argS</i>	Аргинил-tPHK лигаза arginyl-tRNA ligase	62,400	5,08	биосинтез макромолекул, активация аминокислот (аминоацетилтрансферазная активность для трансляции белка)	ЦП
	34	A6QGU5	<i>asd</i>	Аспартат-семиальдегид дегидрогеназа aspartate-semialdehyde dehydrogenase	36,434	4,90	биосинтез аминокислот (оксидоредуктазная активность)	ЦП

Группа белков	№ п/п	Номер доступа	Обозначение гена	Название белка	ММ, кДа	pI	Участие в биологическом процессе	Локализация
Метаболизм, процессы биосинтеза	35	A6QF11	<i>cdr</i>	КоА-дисульфид редуктаза coenzyme A disulfide reductase	49,375	5,35	окислительно-восстановительный процесс (оксидоредуктазная активность, связывание нуклеотидов)	ЦП
	36	A6QGU6	<i>dapA</i>	Дигидропиколинат синтаза 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	32,564	4,80	биосинтез аминокислот (карбоновой кислоты, лизина)	ЦП
	37	A6QGU7	<i>dapB</i>	Дигидропиколинат редуктаза 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	26,638	5,23	биосинтез аминокислот, окислительно-восстановительный процесс	ЦП
	38	A6QDC3	<i>deoB</i>	Фосфопентамутаза Phosphopentomutase	43,826	4,98	фосфоорганический биосинтез, в т.ч. рибозофосфатный	ЦП
	39	A6QFB6	<i>gcvH</i>	Белок Н системы расщепления глицина* Glycine cleavage system H protein	14,084	3,99	катализирует деградацию глицина	ЦП
	40	A6QE10	<i>gltX</i>	Глутамат-tPHK синтаза glutamate-tRNA ligase	39,990	5,21	биосинтез макромолекул, активация аминокислот (tPHK-аминоацилирование для трансляции белка)	ЦП
	41	A6QI14	<i>hemH</i>	Феррохелатаза ferrochelataze	35,208	4,87	катализирует биосинтез, перенос ионов железа к протопорфиру IX	ЦП
	42	A6QIV7	<i>glyA</i>	Серин-гидроксиметилтрансфераза serine hydroxymethyltransferase	45,318	5,75	превращение серина и глицина	ЦП
	43	A6QGK7	<i>glnA</i>	глутаминсинтаза glutamine synthetase	51,749	5,05	биосинтез карбоновой кислоты и глутамина, метаболизм азота	ЦП
	44	A6QIS1	<i>kdpB</i>	Калий-транспортная АТФ-аза potassium-transporting ATPase B chain	73,454	5,32	катализирует гидролиз АТФ в сочетании с обменом водорода и ионов калия	МС
	45	A6QEE3	<i>metS</i>	Метионин-tPHK лигаза methionine-tRNA ligase	74,838	5,16	элонгация белка, инициация трансляции mPHK	ЦП
	46	A6QD58	<i>tycG</i>	Гистидинкиназа sensor kinase protein	69,972	5,58	входит в 2-х компонентную систему, участвующую в фосфорилировании; регулирующую автолиз, образование пленки, метаболизм клетки	МС

**Примечание:** обозначение локализации белков: н/и – не изучено; ЦП – в цитоплазме; ВК – внеклеточно; КС – в клеточной стенке.

рый на заключительном этапе гликолиза превращается в лактат. Кроме того, часть пирувата декар-

бокслируется в аэробных условиях при участии ферментов пируватдегидрогеназного комплекса

(№ 15 и 16) и окисляется в ацетил-КоА, который затем проходит превращения в цикле трикарбоновых кислот. При этом, особенно в дыхательной цепи (в аэробном процессе), а также в анаэробном гликолизе, происходит накопление энергии;

II группа – 6 белков (№ 20 и 21 – хлопьеобразующие факторы А и В, № 23 и 24 – серин-аспартатные белки С и Е, № 25 – гаптоглобин связывающий поверхностный белок), относящихся, соответственно, к факторам патогенности и стрессовым белкам;

III группа – стрессовые белки – белка (№ 26 – молекулярный шаперон Hsp31, № 27 – супероксиддисмутаза, № 28 – тиоредоксинредуктаза, № 29 – АТФ-зависимая протеиназа);

IV группа – остальные белки (№№ 30 – 46) составляют обширную группу белков, участвующих в различных метаболических и биосинтетических процессах.

С использованием таких же протеомных методов исследователи идентифицировали сотни белков [15 – 17]. Так, А.К. Ziebandt с соавт. [17] идентифицировали 43 внеклеточных белка *S. aureus*, а М. Nakano с соавт. [16] – 29 внеклеточных белков, образуемых метициллин-резистентными штаммами *S. aureus*. При изучении встречаемости белков в экзопротеоме 25-ти клинических изолятов *S. aureus*, из 63-х идентифицированных секретированных белков только 7 отмечены у всех изолятов (Aly, IsaA, Lip, LytM, Nuc, SA0620 и SA2097) [15]. Следует отметить, что, несмотря на использование в анализе той же программы Mascot, которая была применена и в нашем исследовании «исходного» белоксодержащего соединения, в нем выявлен лишь белок – SA0295, один из редко отмеченных авторами (у менее чем в 20% изученных штаммов). М. J. Sibbald [15] заключает, что пластичность генома *S. aureus* является одним из факторов, влияющих на гетерогенность профиля экзопротеома и обоснованно делает важные предположения:

- во-первых, гетерогенная экспрессия генов, в частности генов вирулентности, наблюдаемая *in vitro*, в еще большей степени влияет на вариативность *in vivo*;
- во-вторых, с этими различиями в вирулентности штаммов могут быть связаны различия в клинических проявлениях инфекции у разных хозяев;
- в-третьих, поскольку сравнение профилей экспрессии генов вирулентности штаммов-изолятов выявило, что они индуцируют весьма сходные симптомы, исследователи надеются идентифицировать протеомное обозначение

симптомов, что поможет понять специфические механизмы патогенности;

- в-четвертых, показано, что носительство *S. aureus* повышает уровень высокоселективного и протективного антительного ответа на суперантигены колонизирующих штаммов. Подобно этому специфический адаптивный иммунный ответ может усиливаться в ответ на другие факторы вирулентности, которые также варьируют между штаммами. Авторы предполагают, что этим можно объяснить тот факт, что носители *S. aureus*, у которых впоследствии развивается бактериемия, имеют лучший прогноз исхода, чем неносители.

Таким образом, проведенное изучение протеома II БСС, полученного в конце фазы экспоненциального роста *S. aureus* № 6, подтвердило результаты других исследователей, касающиеся идентификации большого количества секретированных белков и слабого совпадения (на данном этапе изучения) рассматриваемых белков в выделенных клинических изолятах и экспериментальных штаммах. Это в большой степени объясняется, вероятно, разными методическими подходами к выделению белоксодержащих соединений, их характеристике и требует дальнейшего изучения их роли в жизнедеятельности бактериальной клетки и в воздействии на макроорганизм для выявления их участия, в частности, в составе комплекса эффективных протективных антигенов.

### Выводы

1. При протеомном анализе внеклеточного белоксодержащего соединения (II БСС) *S. aureus* № 6, обладающего протективными свойствами и способностью снижать обсемененность почек мышей и формирование абсцессов почек, идентифицировано 46 белков, участвующих в различных биологических процессах.
2. Наибольшую группу (19 белков) составляют ферменты углеводного обмена, 8 из которых участвуют в ключевых этапах гликолиза; определены 6 белков, относящихся к факторам патогенности (в том числе хлопьеобразующие факторы А и В, гаптоглобинсвязывающий поверхностный белок), и 4 стрессовых белка.
3. Полученные результаты подтверждают положение о пластичности генома *S. aureus*, влияющего на гетерогенность профиля экзопротеома, что в большой степени определяет сложности в разработке эффективных противостафилококковых вакцин.

### Литература

1. Майчук Д.Ю., Дехнич А.В., Сухорукова М.В. Оценка перспективности применения нетилицилина для топической терапии бактериальных инфекций в офтальмологии с учетом чувствительности основных возбудителей в РФ. *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2015; 17 (3): 241 – 249.
2. Теплякова О.В., Руднов В.А., Шлыкова Г.И., Доценко Т.Г. Септический артрит у взрослых. *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2015; 17 (3): 187 – 206.

3. Bayer A.S. Staphylococcal bacteremia and endocarditis. Arch. Intern. Med. 1982; 142: 1169 – 1177.
4. Sheagren J.N. *Staphylococcus aureus* – the persistent pathogen. N. Engl. J. Med. 1984; 310: 1368 – 1373.
5. Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В., Власова Е.Е., Данилова Е.М., Дехнич А.В. и др. Этиология инфекционного эндокардита в России. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2015; 17 (1): 4 – 10.
6. Kennedy A.D., Otto M., Braughton K.R., Whitney A.R., Chen L., Mathema B. et al. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105: 1327 – 1332.
7. Baba T., Bae T., Schneewind O., Takeuchi F., Hiramatsu K. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. J. Bacteriol. 2008; 190: 300 – 310.
8. Diep B.A., Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. Trends Microbiol. 2008; 16 (8): 361 – 369.
9. Tsompanidou E., Denham E.L., Becher D., de Jong A., Buist G., van Oosten V. et al. Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 2013; 79: 886 – 895.
10. van den Berg S., Koedijk D.G.A.M., Back J.W., Neef J., Dreisbach A., van Dijk J.M., Bakker-Woudenberg I.A.J.M., Buist G. Active Immunization with an Octa-Valent *Staphylococcus aureus* Antigen Mixture in Models of *S. aureus* Bacteremia and Skin Infection in Mice. PLoS ONE. 2015; 10 (2): e0116847.
11. Donenko F.V., Gruber I.M., Semenova I.B., Priyatkin R.G., Ziganshin R.H., Zaryadyeva E.A. et al. Growth-dependent release of carbohydrate metabolism-related and antioxidant enzymes from *Staphylococcus aureus* strain 6 as determined by proteomic analysis. Experiment and therapeutic medic. 2011; 2: 1199 – 1204.
12. Тришин А.В., Доненко Ф.В., Курбатова Е.А., Воюшин К.Е., Киселевский М.В., Егорова Н.Б. и др. Протективная активность секретируемых белков *Streptococcus pneumoniae* и *Klebsiella pneumoniae*. Журн. микробиол. 2008; 4: 46 – 50.
13. Грубер И.М., Асташкина Е.А., Лебединская О.В., Егорова Н.Б., Киселевский М.В., Доненко Ф.В. и др. Исследование протективных свойств секретируемых белокосодержащих соединений *Staphylococcus aureus* № 6. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2015; 14 (4): 86 – 93.
14. Shender V.O., Pavlyukov M.S., Ziganshin R.H., Arapidi G.P., Kovalchuk S.I., Anikanov N.A. et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. Mol Cell Proteomics. 2014; 13 (12): 3558 – 3571.
15. The *Staphylococcus aureus* secretome. Rijksuniversiteit Groningen. 2010. Доступно на: <http://www.rug.nl/research/portal/files/14562146/titlecon.pdf>.
16. Nakano M., Kawano Y., Kawagishi M., Hasegawa T., Iinuma Y., Oht M. Two-dimensional analysis of exoproteins of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) for possible epidemiological applications. Microbiol Immunol. 2002; 46: 11 – 22.
17. Ziebandt A.K., Becher D., Ohlsen K., Hacker J., Hecker M., Engelmann S. The influence of agr and sigma B in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. Proteomics. 2004; 4: 3034 – 3047.

## References

1. Maychuk D.Yu., Dekhnichev A.V., Sukhorukova M.V. Surveillance of activity of netilmicin in comparison with other antimicrobials against Russian ophthalmic bacterial isolates. Clin Microbiol Antimicrob Chemother. 2015; 17 (3): 241 – 249 (in Russian).
2. Teplyakova O.V., Rudnov V.A., Shlykova G.I., Dotsenko T.G. Septic arthritis in adult. Clin. Microbiol. Antimicrob. Chemother. 2015; 17(3): 187 – 206 (in Russian).
3. Bayer A.S. Staphylococcal bacteremia and endocarditis. Arch. Intern. Med. 1982; 142: 1169 – 1177.
4. Sheagren J.N. *Staphylococcus aureus* – the persistent pathogen. N. Engl. J. Med. 1984; 310: 1368 – 1373.
5. Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В., Власова Е.Е., Данилова Е.М., Дехнич А.В. Этиология инфекционного эндокардита в России. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2015; 17 (1): 4 – 10 (in Russian).
6. Kennedy A.D., Otto M., Braughton K.R., Whitney A.R., Chen L., Mathema B. et al. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2008; 105: 1327 – 1332.
7. Baba T., Bae T., Schneewind O., Takeuchi F., Hiramatsu K. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. J. Bacteriol. 2008; 190: 300 – 310.
8. Diep B.A., Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. Trends Microbiol. 2008; 16 (8): 361 – 369.
9. Tsompanidou E., Denham E.L., Becher D., de Jong A., Buist G., van Oosten V. et al. Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 2013; 79: 886 – 895.
10. van den Berg S., Koedijk D.G.A.M., Back J.W., Neef J., Dreisbach A., van Dijk J.M., Bakker-Woudenberg I.A.J.M., Buist G. Active Immunization with an Octa-Valent *Staphylococcus aureus* Antigen Mixture in Models of *S. aureus* Bacteremia and Skin Infection in Mice. PLoS ONE 2015; 10(2): e0116847.
11. Donenko F.V., Gruber I.M., Semenova I.B., Priyatkin R.G., Ziganshin R.H., Zaryadyeva E.A. et al. Growth-dependent release of carbohydrate metabolism-related and antioxidant enzymes from *Staphylococcus aureus* strain 6 as determined by proteomic analysis. Experiment. and therapeutic medic. 2011; 2: 1199 – 1204.
12. Trishin A.V., Donenko F.V., Kurbatova E.A., Voyushin K.E., Kiselevsky M.V., Egorova N.B. et al. Protective activity of secreted proteins of *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae*. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 4: 46 – 50 (in Russian).
13. Gruber I.M., Astashkina E.A., Lebedinskaya O.V., Egorova N.B., Kiselevsky M.V., Donenko F.V. et al. Immunogenic activity of secreted protein-based compounds *Staphylococcus aureus* № 6. Epidemiology & Vaccinal Prevention. 2015; 14 (4): 86 – 93 (in Russian).
14. Shender V.O., Pavlyukov M.S., Ziganshin R.H., Arapidi G.P., Kovalchuk S.I., Anikanov N.A. et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. Mol Cell Proteomics. 2014; 13 (12): 3558 – 3571.
15. The *Staphylococcus aureus* secretome. Rijksuniversiteit Groningen. 2010. Available at: <http://www.rug.nl/research/portal/files/14562146/titlecon.pdf>.
16. Nakano M., Kawano Y., Kawagishi M., Hasegawa T., Iinuma Y., Oht M. Two-dimensional analysis of exoproteins of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) for possible epidemiological applications. Microbiol Immunol. 2002; 46: 11 – 22.
17. Ziebandt A.K., Becher D., Ohlsen K., Hacker J., Hecker M., Engelmann S. The influence of agr and sigmaB in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. Proteomics. 2004; 4: 3034 – 3047.

## КОРОТКОЙ СТРОКОЙ

### Живая гриппозная вакцина безопасна для детей с аллергией

Аллергия на куриный белок может больше не считаться противопоказанием для введения интраназальной живой гриппозной вакцины (ЖИВГ).

Для оценки безопасности ЖИВГ было отобрано 779 детей в возрасте 2 – 18 лет, страдающих аллергией на яичный белок. Согласно данным клинических исследований, у 270 участников (34,7%) ранее фиксировались анафилактические реакции на яйца, у 157 человек (20,1%) аллергия была выражена респираторным синдромом и реакцией со стороны сердечно-сосудистой системы. Также у 57,1% участников была диагностирована астма.

Все пациенты прошли иммунизацию ЖИВГ, не были отмечены системные аллергические реакции на содержащийся в препарате яичный белок. Ученые отмечают, что

только у 9 участников (1,2%) была зафиксирована умеренная реакция на вакцину сразу после ее введения. Об отсроченной аллергической реакции, возможно связанной с иммунизацией, сообщил 221 пациент, при этом никому из участников изучения не понадобилась госпитализация.

По результатам исследования был сделан вывод, что ЖИВГ безопасна для иммунизации детей с аллергией на яичный белок, так как она хорошо переносится даже пациентами, страдающими астмой.

*Источник: Safety of live attenuated influenza vaccine in young people with egg allergy: multicentre prospective cohort study. BMJ 2015; 351: h6291.*