

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛДЕРИЙ

MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS OF PROTEINS OF DIFFERENT STRAINS OF PATHOGENIC BURKHOLDERIA

T. Sharov
E. Korol
A. Budchenko

Summary. The article is devoted to the assessment of differences in the pools of general cellular proteins of the melioidosis pathogen and closely related microorganisms of the genus *Burkholderia*.

The aim of the work was to search for potential protein markers specific for the species *Burkholderia pseudomallei*. **Methods.** The objects of the study were the collection strains of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, as well as individual proteins isolated from electropherograms of these strains. The cell mass of the strains grown on a dense nutrient medium was disinfected, then the protein components were separated by two-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gel. The spots of interest were cut out, digested with trypsin, and then identified using the MASCOT search engine. **Results.** About 75 individual proteins were isolated and analyzed. Proteins specific both to all the studied strains of the genus *Burkholderia* and to strains of the «*Burkholderia pseudomallei*» group were determined. It has been shown that the two-dimensional electrophoresis method is not effective enough to detect differences in protein pools both among different species of pathogenic *Burkholderia* and among strains of the same species.

Keywords: melioidosis, glanders, mass spectrometry, proteomic analysis, electrophoresis.

Шаров Тимур Николаевич

канд. мед. наук, с.н.с. лаборатории
протеомного анализа ФКУЗ «Волгоградский
научно-исследовательский противочумный
институт» Роспотребнадзора
timursharov@gmail.com

Король Екатерина Васильевна

н.с. лаборатории арбовирусных инфекций,
ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора
katherina.korol@mail.ru

Будченко Анатолий Александрович

канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории
арбовирусных инфекций, ФКУЗ «Волгоградский
научно-исследовательский противочумный
институт» Роспотребнадзора
budchenko1976@yandex.ru

Аннотация. Статья посвящена оценке разницы в пулах общеклеточных белков возбудителя мелиоидоза и близкородственных микроорганизмов рода *Burkholderia*.

Целью работы был поиск потенциально возможных белковых маркеров, специфичных для вида *Burkholderia pseudomallei*. **Методы.** Объектами исследования служили коллекционные штаммы *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, а также отдельные белки, выделенные из электрофореграмм этих штаммов. Клеточную массу штаммов, выращенных на плотной питательной среде, обеззараживали, затем разделяли белковые компоненты методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. Интересующие пятна вырезали, расщепляли трипсином, затем идентифицировали с помощью поисковой машины MASCOT. **Результаты.** Выделено и проанализировано порядка 75 отдельных белков. Определены белки, специфичные как для всех исследованных штаммов рода *Burkholderia*, так и для штаммов группы «*Burkholderia pseudomallei*». Показано, что метод двумерного электрофореза недостаточно эффективен для выявления разницы в пулах белков как среди различных видов патогенных буркхольдерий, так и среди штаммов одного вида.

Ключевые слова: мелиоидоз, сап, масс-спектрометрия, протеомный анализ, электрофорез.

Введение

Мелиоидоз — опасное заболевание человека, возбудитель которого, бактерии рода буркхольдерий *Burkholderia pseudomallei*, в настоящее время относят ко второй группе патогенности (опасности) [1]. Представляется достаточно актуальной возможность расширить спектр инструментов, применяемых как в научных исследованиях свойств данных микроорганизмов, так и для совершенствования диагностики вызываемого ими заболевания. Протеомные методы анализа разви-

ваются и эффективно применяются при изучении фенотипических свойств бактерий с целью их ускоренной идентификации. Это приводит к более ранней диагностике вызываемых ими заболеваний путем выявления белков — маркеров микроорганизмов и иммуногенных антигенов, которые позволяют получать высокоспецифичные чувствительные диагностикумы [2]. Harding S.V. et al. применяли протеомные методы исследования для поиска различий в белковом составе у штаммов близкородственных видов *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* [3]. На электрофореграммах после разделения двумерным

электрофорезом суммарных клеточных белков и их анализа был обнаружен целый ряд белков, экспрессия которых в клетках *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* отличалась. Также в литературе описаны эксперименты по разработке диагностических препаратов с использованием данных изучения двумерных протеинограмм и масс-спектров поверхностных и экстрацеллюлярных белков [4]. Протеомные методы анализа используются для изучения изменения состава секретируемых протеинов *B. pseudomallei* при изменении состава питательной среды [5]. Интерес также представляют результаты изучения белка флагеллина у *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, ранее выделенного с помощью протеомного анализа [6]. При этом авторы, выявив изменения в структуре флагеллина у патогенного вида *B. pseudomallei* в сравнении со структурой этого белка из штамма *B. thailandensis*, попытались найти их связь с различиями в вирулентности. Wongtrakongate P. et al. опубликовали сообщение о выделенных белках штамма *B. pseudomallei* и характеристике их с помощью масс-спектрометрии [7]. Chantratita N. et al., используя методы двумерного электрофореза и MALDI-TOF масс-спектрометрии, удалось обнаружить сложные изменения состава секретируемых протеинов в клетках *B. pseudomallei* при смене морфотипа колоний [8]. Glaros T.G. et al. опубликовали результаты изучения эффективности метода, соединяющего в себе жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию, для выявления маркеров болезни обезьян сапом при заражении аэрозольным способом. При этом удалось выявить в сыворотке зараженных животных увеличение в 10–100 раз разновидностей антител к модифицированным белкам, которые появились в результате развития инфекции [9]. Mariappan V. et al. Выявили различия в протеомном составе клеток штамма *B. pseudomallei*, выделенного из почвы в Малайзии и затем пассированного на мышах [10]. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют как о значительном потенциале протеомных методов анализа в отношении изучения состава белков, экспрессируемых патогенными буркхольдериями, так и о важности и значимости исследования *B. pseudomallei*. Работа в данном направлении не только представляет собой несомненный интерес для фундаментальной и прикладной науки, но и в перспективе будет способствовать разработке и совершенствованию препаратов для диагностики сапа и мелиоидоза.

Материалы и методы

Объектами исследования служили штаммы *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. ceracia* из коллекции ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, масс-спектры *B. pseudomallei* (авирулентный штамм 100, вирулентный штамм 107, чувствительный к антибиотикам штамм TtCM), *B. mallei* (вирулентный штамм 10230), *B. thailandensis* (международный штамм 264), *B.*

ceracia (штамм 2541), а также отдельные белки, выделенные из двумерных электрофореграмм *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. ceracia*. Бактериальную массу выращивали на твердой питательной среде F-агаре в матрасе. На скошенный в матрасе агар наносили суспензию суточной агаровой культуры (109 м.к./мл) в 0,15 М NaCl, проводили инкубацию при 37 °С в течение 18 ч. Вариант изоэлектрофокусирования в стеклянных трубках проводили на аппарате Андерсона [15]. Полученные при изоэлектрофокусировании гели помещали на пластину полиакриламидного геля и проводили электрофоретическое разделение в течение ночи. Двумерные гели окрашивали Кумасси G-250 и нитратом серебра. Фотографии гелей получали с помощью геледокументирующей системы «Gel Doc XR» и программного обеспечения ImageLab. Для дальнейшего анализа применяли инструменты программы «PDQuest». На следующем этапе осуществляли экстракцию отдельных пятен и фракций из двумерных протеинограмм. Выделяли их из геля, проводили трипсинолиз белков и идентификацию с помощью масс-анализатора Axima Confidence. Идентификацию белков проводили через поисковую машину Mascot и базу данных SwissProt.

Результаты

В целом на этапе отработки процедуры выделения из двумерных протеинограмм было экстрагировано и проанализировано порядка 70 отдельных белков. Часть из них представляла собой крупные фракции и присутствовала и на электрофореграммах всех исследованных штаммов рода *Pseudomallei* (Таблица 1).

Как видно из таблицы 1, достаточно большая часть общих белков (более 30 %) относится к рибосомальным белкам, как компонентам, так и участникам синтеза белка. Это согласуется с данными литературы, поскольку рибосомальные белки являются одними из наиболее количественно представленных белков (более 10 %) как для эукариот, так и для прокариот [11]. Кроме того, они относятся к консервативным белкам, и именно профиль рибосомальных белков часто используется для масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов [12]. Пять идентифицированных белков (15 %) относятся к компонентам мембраны и структурным белкам, также присутствующим в клетке в большом количестве. Оставшиеся белки в основном задействованы в энергетическом цикле, фолдинге белка, нуклеиновых кислот, либо являются неспецифическими компонентами клеточного метаболизма. Данные белки присутствуют во многих прокариотических и эукариотических клетках, поэтому логично их наличие в протеинограммах всех исследованных штаммов рода *Burkholderia* в значительном количестве. Два белка охарактеризованы как гипотетические. В таблице 2 представлены результаты идентификации белков, присутствующих только на протеинограммах

Таблица 1.
Результаты идентификации основных мажорных белков, выделенных из двумерных гелей «*Burkholderia pseudomallei* 100», «*Burkholderia pseudomallei* 107», «*Burkholderia pseudomallei* TtcM», «*Burkholderia mallei* 10230» «*Burkholderia thailandensis* 264», «*Burkholderia cepacia* 2541»

№	Название	Масса фрагмента в геле, кДа
1	Предположительно транспортер внешней мембраны	84
2	Микробная коллагеназа	83
3	Фактор элонгации 4	76
4	Шаперон «GroEL»	70
5	Гипотетический мембранный белок	69
6	Цитидин-5-прим-трифосфатсинтаза	69
7	Предположительно АМФ-связывающий белок	68
8	Предположительно белок наружной мембраны	60
9	АТФ-аза, компонент секреции 3 типа	59
10	Предположительно порин наружной мембраны	55
11	Многофункциональный ССА-белок	53
12	Хитинсвязывающий белок	52
13	Гипотетический белок	50
14	Метилтрансфераза «RlmN»	48
15	Субъединица АТФ-зависимой протеазы	41
16	dTDP-4-дегидрорамнозная редуктаза	40
17	Ацетальдегид-дегидрогеназа	39
18	Предположительно белок семейства цитохромов	38
19	50S рибосомальный белок L2	33
20	Рибонуклеаза «РН»	31
21	Рибосомальный белок L2	30
22	50S рибосомальный белок L3	29
23	30S рибосомальный белок S4	28
24	Метилтрансфераза E, участвующая в синтезе большой субъединицы рибосомы	28
25	ДНК-связывающий белок	21
26	30S рибосомальный белок S12	19
27	ГТФ-аза, участвующая в созревании малой субъединицы рибосомы	10

исследованных штаммов *Burkholderia pseudomallei* (100, 107, TtcM). Пять белков (ацетилтрансфераза, глутаматкиназа, АТФ-аза, две фосфатазы) имеют гомологию с ферментами клеточного метаболизма, один задействован в процессе созревания РНК. Также можно отметить наличие двух гипотетических белков, одного мембранного и белка — компонента секреторной системы. Шесть белков охарактеризованы как гипотетические.

Таблица 2.
Результаты идентификации белков, выделенных только из двумерных гелей «*Burkholderia pseudomallei* 100», «*Burkholderia pseudomallei* 107», «*Burkholderia pseudomallei* TtcM»

Вид	Название	Масса фрагмента
<i>B. pseudomallei</i>	Предположительно белок с фосфатазной активностью	56
<i>B. pseudomallei</i>	Аминогликозид-ацетилтрансфераза	23
<i>B. pseudomallei</i>	Глутаматкиназа	43
<i>B. pseudomallei</i>	Предположительно транспортный белок наружной мембраны, осуществляющий перенос катионов	50
<i>B. pseudomallei</i>	АТФ-аза, ассоциированная с протеосомой	80
<i>B. pseudomallei</i>	Предположительно белок, ассоциированный с системой секреции 4 типа	62
<i>B. pseudomallei</i>	Эндорибонуклеаза «YbeY»	24
<i>B. pseudomallei</i>	Гипотетический белок	41
<i>B. pseudomallei</i>	Гипотетический белок	52
<i>B. pseudomallei</i>	Трегалоза-фосфатаза	36
<i>B. pseudomallei</i> 100	Белок, ассоциированный с системой секреции 3 типа	26
<i>B. pseudomallei</i> 100	Гипотетический белок	38
<i>B. pseudomallei</i> 100	Белок, ассоциированный с системой секреции 3 типа	71
<i>B. pseudomallei</i> 100	Белок, содержащий домен «RRP1-C»	42
<i>B. pseudomallei</i> 107	РНК-ассоциированная диметилаллилтрансфераза	30
<i>B. pseudomallei</i> 107	Белок с функцией киназы «UbiB»	64
<i>B. pseudomallei</i> 107	Гипотетический белок	69

Вид	Название	Масса фрагмента
<i>B. pseudomallei</i> TtcM	Тимидилат-киназа	26
<i>B. pseudomallei</i> TtcM	Гипотетический белок	23
<i>B. pseudomallei</i> TtcM	Гипотетический белок	58
<i>B. pseudomallei</i> TtcM	Неохарактеризованный белок-транспортер MFS -типа	50

В случае с белками вирулентного штамма *Burkholderia pseudomallei* 100, а также авирулентного *Burkholderia pseudomallei* 107 уникальные для штамма пятна были обнаружены в небольшом количестве, что обуславливало трудность их выделения. В обоих случаях один из белков был охарактеризован как гипотетический. Один из белков (киназа «UbiB») задействован в энергетическом цикле, и у обоих штаммов обнаружено по одному белку, участвующему в метаболизме нуклеиновых кислот («RPAP1-C»-белок у *Burkholderia pseudomallei* 100 и диметилаллилтрансфераза у *Burkholderia pseudomallei* 107). Помимо этого, у *Burkholderia pseudomallei* 100 присутствуют два белка, ассоциированные с системой секреции 3 типа. Хотя сами белки не секреторные, а являются компонентами мембранного белкового комплекса, тем не менее это согласуется с данными некоторых исследований механизмов патогенности вида *Burkholderia pseudomallei* [14]. Штамм TtcM отличается меньшей резистентностью к антибиотикам в отличие от остальных представителей *Burkholderia* [15]. Как в случае *Burkholderia pseudomallei* 100 и 107, было обнаружено небольшое количество белков. Относительно малые различия в белковом составе между штаммами одного вида также подтверждают и трудностью внутривидовой дифференциации микроорганизмов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии, основанной на детекции белков. По данным литературы основная масса штаммоспецифичных молекул — это полисахариды и липиды [16]. Один из белков относится к неспецифическому семейству транспортеров, и ещё один (киназа) задействован в энергетическом цикле клетки. Два белка охарактеризованы как гипотетические, их функции пока неизвестны.

Обсуждение

Целью исследования являлся поиск возможных белковых маркеров возбудителей сапа, мелиоидоза, а также близкородственных видов буркхолдерий. Как можно видеть из таблиц 1 и 2, в пулах видоспецифичных

белков, наряду с белками с известной функцией, также присутствуют так называемые гипотетические белки (hypothetical proteins). Гипотетическими в данном случае называют белки, чья структура предсказана только по последовательностям нуклеиновых кислот. Т.е. в геноме микроорганизма есть открытая рамка считывания, которая теоретически соответствует идентифицированной аминокислотной последовательности, но экспериментально такой белок не был выделен или описан [18]. Их предполагаемую роль можно определить, исходя из гомологии с известными белками в базах данных. Согласно различным литературным данным протеомы большинства бактерий на 20–40 % состоят из гипотетических белков, не выделенных экспериментально. Кроме того, среди идентифицированных белков 8 % относятся к компонентам систем секреции нескольких типов. Эти системы многокомпонентные и достаточно хорошо изучены как в целом, так и у *Burkholderia spp.* По данным многих исследований, они играют важную роль как в вирулентности, так и в механизмах патогенеза большинства видов буркхолдерий [19, 20].

Заключение

Как видно из результатов исследования, для микроорганизмов рода *Burkholderia* в целом характерно достаточно большое разнообразие пула внутриклеточных белков, что подтверждается при их исследовании методами электрофореза и масс-спектрометрии. Показано также, что существенная часть специфичных для вида белков относится к гипотетическим, что соотносится с информацией из публикаций результатов схожих исследований. Результаты работы показали эффективность использования протеомного метода для определения и выделения маркерных белков патогенных буркхолдерий. Анализ большего количества штаммов рода *Burkholderia* представляется актуальным продолжением работы, это позволило бы подтвердить или дополнить полученные данные за счёт повторности исследования. Кроме того, показано, что использование электронных карт распределения белков в качестве дополнительного метода дифференциации *Burkholderia pseudomallei* от *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, представляется малоэффективным. Прежде всего за счёт длительности и трудоёмкости получения пригодных для корректного сравнения карт, а также из-за трудности определения того, отражает ли расположение малых белковых фракций различия в протеомах штаммов, или оно обусловлено разницей в условиях получения самого геля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней.
2. Harding S.V., Sarkar-Tyson M., Smither S.J., Atkins T.P., Oyston P.C.F., Brown K.A., Liu Y., Wait R., Titball R.W. The identification of surface proteins of *Burkholderia pseudomallei*. *Vaccine*. 25 (2007): 2664–2672.
3. Wongtrakongate P., Mongkoldhumrongkulb N., Chaijanc S., Kamchonwongpaisanc S., Tungpradabkulb S. Comparative proteomic profiles and the potential markers between *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Mol. Cel. Probes*. 21 (2007): 81–91.
4. Thompson D., Crandall K., Harding S., Smither S.J., Kitto G., Titball R., Brown K. In silico analysis of potential diagnostic targets from *Burkholderia pseudomallei*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008; 102: S1, S61 S65.
5. Pumirat P., Sinchaikul S.P., Chen S-T., Korbrisate S., Thongboonkerd V. Altered secretome of *Burkholderia pseudomallei* induced by salt stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1794: 898–904.
6. Scott A., Twine S., Fulton K., Titball R., Essex-Lopresti A., Atkins T. Prior J.. Flagellar Glycosylation in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*/ *J. of Bacteriology*, 2011. 14 V. 193: 3577–3587.
7. Patompon W., Sittiruk R., Sukkid Y., Sumalee T. A Proteome Reference Map of the Causative Agent of Melioidosis *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2011, P1-5/Volume 2011, Article ID 530926, 5 pages16*.
8. Narisara C., Sarunporn T., Chanthiwa W., Lily A. Trunck, Drew A. et al. Proteomic analysis of colony morphology variants of *Burkholderia pseudomallei* defines a role for the arginine deiminase system in bacterial survival. *journal of proteomics* 75 (2012) 1031–1042
9. Glaros T., Blancett C., Bell T., Natesan M., Ulrich R. Serum biomarkers of *Burkholderia mallei* infection elucidated by proteomic imaging of skin and lung abscesses. *Clinical Proteomics* (2015) 12:7 DOI 10.1186/s12014-015-9079-4 Page 2 of 14
10. Mariappan V., Vellasamy K.M., Vadivelu J. Host-Adaptation of *Burkholderia pseudomallei* Alters Metabolism and Virulence: a Global Proteome Analysis. Published: *Scientific reports*. August 2017. Vol. 7:21
11. Yutin N., Pere P., Koonin E., Wolf Y. Phylogenomics of Prokaryotic Ribosomal Proteins. *PLoS One*. 2012; 7(5): e36972.
12. Suarez S., Ferroni A., Lotz A., Jolley K., P. Guérin. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J Microbiol Methods*. 2013 Sep; 94(3): 390–396
13. Yu Z., John A. Ramshaw. A. et al. Bacterial collagen-like proteins that form triple-helical structures. *J. Struct. Biol*. 2014 Jun; 186(3): 451–461
14. Broek C., Stevens J. Type III Secretion in the Melioidosis Pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 255.
15. Rhodes K., Schweizer H. Antibiotic Resistance in *Burkholderia* Species. *Drug Resist Updat*. 2016 Sep; 28: 82–90
16. Sandrin T., Goldstein J., Schumaker S. MALDI-TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review. *Mass Spectrom Rev*. 2013 May-Jun;32(3):188-217
17. O'Grady E., Sokol P. et al. *Burkholderia cenocepacia* Differential Gene Expression during Host–Pathogen Interactions and Adaptation to the Host Environment. *Front Cell Infect Microbiol*. 2011; 1: 15
18. Anders J., Petruschke H., Jehmlich N., Haange S., Bergen M. Et al. A workflow to identify novel proteins based on the direct mapping of peptide-spectrum-matches to genomic locations. *BMC Bioinformatics volume 22: 277*
19. Vander C., Stevens J. Type III Secretion in the Melioidosis Pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 15 June 2017
20. Schwarz S., West E., Boyer F., Chiang W., Carl M. et al. *Burkholderia* Type VI Secretion Systems Have Distinct Roles in Eukaryotic and Bacterial Cell Interactions. *PLoS Pathog*. 2010 Aug 26;6(8):e1001068

© Шаров Тимур Николаевич (timursharov@gmail.com); Король Екатерина Васильевна (katherina.korol@mail.ru);

Будченко Анатолий Александрович (budchenko1976@yandex.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»