

На правах рукописи

Чайка Софья Олеговна

**MALDI-TOF масс-спектрометрический дифференциальный анализ
протеома штаммов *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* и диагностического
бактериофага *El Tor***

03.01.04 - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Телесманич Наталья Робертовна

Официальные оппоненты:

Тикунова Нина Викторовна - доктор биологических наук, зав лабораторией молекулярной микробиологии Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Пельтек Сергей Евгеньевич кандидат биологических наук, руководитель Лаборатории молекулярных биотехнологий Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Ведущая организация:

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет» (г.Ростов-на-Дону)

Защита состоится «___» _____ 202__ г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.048.04 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <http://frcftm.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 202__ г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Русских Галина Сергеевна

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Метод времяпролетной масс-спектрометрии на базе матрично-активированной лазерной десорбции / ионизации с времяпролетным разделением ионов (MALDI-ToF-MS) – это физико – биохимический метод разделения белков в вакууме под действием лазерного луча и определения комплекса молекулярных масс клеток или тканей, с целью выявления маркеров патологического процесса, на основе создания коллекций масс-спектров протеома виртуальных образцов. С помощью различных вариантов MALDI описаны белки *Vibrio cholerae*, участвующие в ферментации сорбита, в функции которых входит метаболизм сахаров и аминокислот (Yan et al., 2009), описаны особенности метаболизма дыхательной цепи и переноса электронов у представителей Ogava и Inaba (Chmelik et al., 2007). В связи с отсутствием в референтной базе данных, масс-спектров протеомов представителей холерных вибрионов затруднено изучение отдельных белков ассоциированных с их биохимическими свойствами и их дифференциация.

E.coli является тем микроорганизмом, изучение которого лежало в основе масс-спектрометрической идентификации (Arnold et al., 1998; Jones et. al., 2003; Pribil et al., 2005). Модифицированный коммерческий препарат белкового лизата DH-5-alpha *E.coli* (Bruker bacteria test standart) используется в качестве бактериального стандарта калибровки для метода MALDI. В коммерческой базе данных Bruker находятся несколько протеомных профилей референтных штаммов *E.coli* . Однако в настоящее время в мире встречаются штаммы с измененными свойствами (Кафтырева и др., 2011). Создание MALDI-ToF коллекций протеомов штаммов *E.coli* и поиск маркеров протеома между различными биохимическими кластерами, позволит идентифицировать таксон-специфические белки гемолитических штаммов (Гапон, 2015, 2016;). Все вышеизложенное обосновывает актуальность создания баз данных протеомов клеток штаммов *V. cholerae* и *E.coli*.

Бактериофаги являются постоянным спутником патогенных бактерий в природе (Hendrix, 2002), а их внедрение в микробные клетки, не приводящие к

лизису, обеспечивают появление новых свойств и эволюционную приспособляемость бактерий (М. Ломов и др., 2007). Обнаружена способность углевода D- маннозы ингибировать MSHA позитивные штаммы, указывая на то, что MSHA пили являются лектиновыми (углеводсвязывающими) рецепторами бактериофага KSF-1phi. Таким образом, формируется фагорезистентность клеток *Vibrio cholerae*. Рецепторы фагов, иной чем маннозочувствительной (MSHA) углеводной специфичности не описаны. В литературе не найдено ни одной работы, посвященной масс-спектрометрическому исследованию бактериофагов.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей диссертационной работы является: создание протеомных коллекций масс-спектров и компьютерный анализ константных и переменных белков различных представителей энтеробактерий и бактериофага El Tor для идентификации масс-зарядов, отражающих таксон-специфическую, биохимическую принадлежность.

Для выполнения поставленной цели были сформулированы соответствующие задачи:

1. Провести MALDI-ToF-MS прямое белковое профилирование биохимически охарактеризованных штаммов коллекций клеток *Escherichia coli* и *Vibrio cholerae*, создать базы данных масс-спектрометрических протеомных профилей.
2. Провести дифференциальный анализ протеома коллекции представителей *Escherichia coli* внутри вида на основе таксон-специфических маркерных белков характерных для гемолитических и негемолитических вариантов.
3. Идентифицировать таксон-специфические белки, характерные для биоваров и серогрупп *Vibrio cholerae*, и протеомные маркеры ассоциированные с токсигенностью в формате MALDI-TOF.
4. Подобрать и адаптировать методику масс-спектрометрического профилирования для снятия белкового спектра бактериофага и чувствительной к нему культуры. Изучить роль углеводсвязывающих рецепторных комплексов бактериофага.
5. Оценить изменения протеомного профиля диагностического бактериофага *El Tor*, чувствительных к нему клеток *Vibrio cholerae* и масс-

спектрометрического протеомного профиля, полученного после их совместной инкубации.

Научная новизна. Впервые разработаны масс-спектрометрические методические подходы протеомного анализа рецепторных белков диагностического монофага El Tor и углеводных лигандов их на поверхности чувствительной клетки на модели изучения протеомов холерных вибрионов El Tor и стандартизированного препарата холерного диагностического бактериофага El Tor.

Впервые получен стабильный белковый профиль холерного бактериофага, профиль фага провзаимодействовавшего с культурой. Описаны изменения, происходящие с протеомом бактериофага El Tor и чувствительного к нему штамма *V. cholerae* El Tor 18507 при инкубации с углеводами. Впервые разработан способ изучения лектиновых (углеводных) рецепторов бактериофага El Tor методом конкурентного ингибирования углеводами, при использовании протеомной линейной масс-спектрометрии. Впервые выявлены константные и переменные белки клеток вибрионов на примере штамма *V. cholerae* El Tor 18507, участвующие в каскаде реакций при взаимодействии фага и клетки. Такой протеомный анализ позволил впервые выявить комплекс белков - рецепторов стандартизированного препарата холерного диагностического бактериофага El Tor, имеющих молекулярную массу (m/z) 4373Да. Это комплекс доминантных белков, который поддается гликозилированию сахарозой и ингибируется этим углеводом, что выражается в уменьшении его количества (показателе интенсивности (%)). При взаимодействии с углеводными лигандами, изменение происходит с бактериофагом, а не с клеткой микроорганизма. При этом бактериофаг изменяет свой протеомный масс-спектрометрический профиль, с невозможностью идентификации по отношению к масс-спектру из базы данных, показатель идентичности профилей Score бактериофага El Tor падает с 2.845 до значения 0.973. При взаимодействии бактериофага El Tor и клетки *V. cholerae* изменение происходит со стороны бактериофага, а не чувствительной к нему клетки микроорганизма, о чем свидетельствует показатель эффективности идентификации Score – для

бактериофага El Tor 0.324, для *V. cholerae* El Tor 2.440, определенные после их взаимодействия. Из чего следует, что при формировании фагоустойчивости большую роль играет изменение самого вириона. Углеводы, введенные в систему фаг-клетка, в частности сахара, отрицательно влияют на фаговую активность, по всей видимости путем гликозилирования рецепторных белков фаговой частицы путем конкурентного ингибирования.

Впервые получена коллекция протеомных масс-спектров представителей *Vibrio cholerae* разных биоваров, выделенных от человека и из объектов окружающей среды в разные годы и охарактеризованных по биохимическим признакам и генам токсигенности (*ctx*-/+, *tcp* -/+). Создана и зарегистрирована MALDI-ToF-MS база данных «Белковые профили масс-спектров представителей вида *Vibrio cholerae* для программы MALDI Biotyper» Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2013620585, бюллетень №2 от 29.04.2013 года. Впервые выявлено, что комплекс белков, имеющих молекулярную массу 3202 Да, ассоциирован с токсигенностью холерных вибрионов, этот масс-заряд может быть использован в масс-спектрометрическом анализе для дифференциации токсигенных и атоксигенных протеомов. Впервые проведен анализ масс-спектра референтного протеома штамма *Vibrio albensis* 4MG 4406 THAM, как микроорганизма наиболее близкородственного к *Vibrio cholerae*, показаны их протеомные различия.

Впервые создана и зарегистрирована масс-спектрометрическая база данных «Коллекция белковых профилей масс-спектров представителей вида *Escherichia coli* гемолитических и негемолитических штаммов выделенных от человека для программы Biotyper». Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2016620877, бюллетень №7 от 28.06.2016. Установлено, что значение масс-заряда комплекса белков с самой высокой интенсивностью – 100% (максимальное количество белков) может служить дифференциальным протеомным таксономическим признаком *Escherichia coli*, по которому без постановки биохимического теста можно определить наличие гемолитических / негемолитических свойств. Так, популяция гемолитических эшерихий, имеет доминантный (100%) комплекс белков с молекулярной массой

(m/z) 9064 Да, который является диагностическим маркером вирулентности, чего не наблюдалось у негемолитической популяции, у которой максимальный комплекс белков сосредоточился в диапазоне 5350-5400 Да.

Теоретическая и практическая значимость. Создана и зарегистрирована база данных «Белковые профили масс-спектров представителей вида *Vibrio cholerae* для программы MALDI Biotyper» Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2013620585, бюллетень №2 от 29.04.2013 года / Чайка И.А., Телесманич Н.Р., Сеина С.О. Выявленный масс-спектрометрический комплекс белков, ассоциированный с токсигенностью *Vibrio cholerae*, имеющий молекулярную массу 3202 Да может служить методом экспресс диагностики возбудителя в формате MALDI-ToF.

Создана и зарегистрирована база данных «Коллекция белковых профилей масс-спектров представителей вида *Escherichia coli* гемолитических и негемолитических штаммов выделенных от человека для программы Biotyper» Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2016620877, бюллетень №7 от 28.06.2016 /Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Чайка И.А. Определены маркерные масс-спектрометрические пики *Escherichia coli* имеющие максимальный уровень белков (100% интенсивности): 9064 Да, характерный для гемолитических штаммов, 5382 Да - для негемолитических штаммов; что позволит совершенствовать дифференциальную диагностику, с помощью выявленных протеомных маркеров.

С помощью масс-спектрометрического анализа получена новая информация о молекулярных массах белков, составляющих структуру вириона бактериофага El Tor, об изменчивости его протеома при взаимодействии с штаммом *Vibrio cholerae* El Tor 18507. Установлено, что при взаимодействии вириона и клетки изменение происходит со стороны бактериофага. Анализ взаимодействия бактериофага El Tor с клеткой *Vibrio cholerae* El Tor 18507 масс-спектрометрическим методом способствовало созданию модели изучения их биохимических структур, (лектиновых рецепторов и углеводных лигандов клетки) ответственных за формирование фагоустойчивости – чувствительности,

что развивает наши представления о структуре вириона и может быть полезным для контроля эффективности лечения бактериофагами, а также диагностики инфекционных болезней фаговым методом.

Полученные нами результаты по методике проведения протеомного анализа микроорганизмов и способу выявления их маркерных белков с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии вошли в раздел рецензируемого учебного пособия для вузов «Строение и функции белков, аминокислот. Азотистый обмен» утвержденное экспертной комиссией по работе с учебными изданиями ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М.Сеченова Минздрава России от 19 апреля 2018г. по области образования здравоохранение медицинские науки. Пособие используется на кафедре общей и клинической биохимии РостГМУ Минздрава РФ для проведения семинарских занятий и чтения лекций.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Наличие в масс-спектрометрическом профиле *V.cholerae* белкового комплекса, с молекулярной массой 3202 Да, характеризует вибрион как токсигенный (*ctx+*), отсутствие его свидетельствует об атоксигенности (*ctx*) штамма.
2. Гемолитические штаммы *Escherichia coli* синтезируют белки, имеющие молекулярную массу (*m/z*) 9064 Да, характеризующуюся масс-спектрометрическим пиком с максимальным уровнем белков (100% интенсивность), который является диагностическим маркером гемолитической популяции.
3. Масс-спектрометрия бактериофага E1 Тог выявила доминантный для бактериофага комплекс белков, имеющий *m/z* 4373Да, который участвует во взаимодействии с углеводными лигандами чувствительной клетки. Углеводы, в частности сахароза, введенные в систему фаг-клетка отрицательно влияют на фаговую активность, что отражается в изменении масс-спектрометрического профиля белков бактериофага.

Апробация работы. Доклады по материалам диссертационной работы были представлены на университетских, региональных, всероссийских и международных конференциях. Их обсуждение проводилось на: Всероссийской

конференции «Холера и патогенные для человека вибрионы» (Ростов 2013, 2014); конференции молодых учёных и специалистов Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора (Уфа, 2013); II международной научно - практической конференции "Актуальные вопросы современной медицины" (Екатеринбург, 2015); XIV Российской научно - практической конференции с международным участием "Обмен веществ при адаптации и повреждении. Дни молекулярной медицины на Дону" (Ростов-на-Дону, 2015-2019); «2-5 итоговой научной сессии РОСТ ГМУ» (Ростов-на-Дону, 2015-2019).

Публикации результатов исследования По теме диссертационного исследования опубликовано 16 научных работ, из них 5 – в журналах, индексируемых в международных базах цитирования Web of Science, Scopus и рекомендованные ВАК, а также получено 2 свидетельства о регистрации базы данных. Издано учебное пособие по биохимии Федерального уровня внедрения

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 187 страницах, содержит введение, обзор литературы, три главы собственных исследований, заключение и выводы, иллюстрирована 17 таблицами и 38 рисунками. Библиография представлена 166 источниками, из них 70 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект и методы исследования. В работе проведен протеомный анализ клеток микроорганизмов. Получено: 144 масс-спектрометрических протеомных профиля *Escherichia coli*, из них гемолитических эшерихий (20 масс-спектров протеома), негемолитических эшерихий (109 масс-спектров протеома), негемолитических вариантов, выделенных из ассоциации с условнопатогенными энтеробактериями родов *Klebsiella* и *Enterobacter* (15 протеомы). 20 штаммов гемолитической популяции, выделены от людей с диагнозом дискинезия желчевыводящих путей (ДЖВП), при обследовании на дизбактериоз из фекалий. (Терновская и др., 2009; Гапон и др., 2015, 2016).

Группа *Vibrio cholerae* представленная 140 масс-спектрометрическими протеомами включала: *V. cholerae* классического биовара (2 протеома), *V. cholerae* биовара *El Tor* (69 протеомов), *V. cholerae* O139 серогруппы (32 протеома), *V. cholerae non O1 / O139* серогрупп (37 протеомов).

Для протеомного профилирования с бактериофага использовали препарат холерного диагностического монофага *El Tor* (производства ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов ТУ 8637-014-01 898 109-2007; Рег. уд. № ФСР 2007/01 532) и чувствительный к нему паспортизированный музейный штамм *V.cholerae* биовар *El Tor* 18507.

Белковые экстракты представителей рода *Vibrio* и *Escherichia coli* получены при содействии «ФКУЗ РостПЧИ Роспотребнадзора» и «ФБУН Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора», за что мы выражаем благодарность.

Препаративные методы экстракции рибосомальных белков микроорганизмов для MALDI-TOF. Все микроорганизмы, использованные в работе, были проведены через процедуру экстракции белков путем лизиса клеток: 1) при помощи муравьиной кислоты и этилового спирта для получения протеомов микроорганизмов *Escherichia coli*; 2) трифторуксусной кислоты и ацетонитрила для протеомного анализа представителей рода *Vibrio* и диагностического бактериофага *El Tor*.

Для экстракции белков микроорганизмов использовали следующие химические растворы:

- **основной органический растворитель – Organic Solvent (OS)** (К 470 мкл бидистиллированной воды добавляли 500 мкл концентрированного ацетонитрила (CH₃CN) и 25 мкл концентрированной трифторуксусной кислоты (TFA)).
- **раствор матрицы** (матрица готовилась на основе Organic Solvent. 2,5 мг α-циано–4-гидроксикоричная кислота (CHCA, Bruker Daltonik) разводили в 250 мкл OS.)
- **80% Трифторуксусная кислота (TFA)** (К 200 мкл бидистиллированной воды добавляли 800 мкл концентрированной трифторуксусной кислоты (TFA)).
- **70% Муравьиная кислота (НСООН)** (К 300 мкл бидистиллированной воды, добавляли 700мкл концентрированной муравьиной кислоты).

- **Подготовка калибровочного стандарта (положительного контроля)** (Препарат DH-5-alpha *E.coli* (Bruker bacteria test standart) лиофилизированной смеси белков *E.coli* с добавлением миоглобина и РНК-азы А растворяется в 50 мкл OS.)

Для изучения роли углеводов-специфических рецепторов, участвующих во взаимодействии микробных клеток холерного вибриона с исследуемым фагом были взяты препараты углеводов – сахароза, D-манноза, глюкоза, D-галактоза, мальтоза, L-арабиноза, N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-маннозамин фирмы Serva в конечной концентрации 1% . В нашей модификации постановка пробы с фагом двухслойным методом, была аналогична методу Грациа, за исключением того, что каждое рабочее разведение фага предварительно инкубировалось с углеводом в конечной концентрации 1% в течение 1 часа. Классический метод использовали в качестве контроля активности фага – бактериофаг без углевода (Гончаренко и др., 2013; Телесманич и др., 2013, 2016). Молекулярные спектры бактериофага E1 Tor идентифицировались программой Biotyper с высоким показателем эффективности идентификации Score 2,845 - высокой степенью достоверности. Все спектры молекулярных масс, полученных протеомов были оцифрованы в MSP-peak List и сохраненные в базу данных, что дало возможность получить их графические характеристики (Гончаренко и др., 2013; Телесманич и др., 2013, 2016).

Постановка ПЦР. Культуры холерных вибрионов были охарактеризованы методом ПЦР на наличие генов *stxAB*, *tcpA* с помощью коммерческого набора «АмплиСенс®*Vibrio cholerae*-FL» (производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) с электрофоретической детекцией.

MALDI-ToF прямое белковое профилирование микроорганизмов производилось на приборе масс-спектрометр MALDI-TOF Autoflex "Bruker Daltonik" (Германия) в линейном режиме в программе FlexControl. Идентификация микроорганизмов, получение масс-спектрометрического паспорта MSP-peak List, построение дендрограммы для филогенетического компьютерного анализа штаммов, создание персонализированных коллекций проводили в программе MALDI Biotyper 3.0. Молекулярные массы белков и пептидов оценивали по m/z в диапазоне масс 2000 - 18000 Да. MS профиль микроорганизмов представляет собой график, где по оси абсцисс отложены

масс-заряды (m/z) (молекулярные массы, т.к. $z = -1$) По оси ординат отражена интенсивность пика (количество белков с конкретной массой относительно максимального – 100%). Масс-пик листа (MSP - Peak List) - это электронный паспорт, отражающий числовую характеристику протеомного спектра микроорганизма, в виде таблицы с указанием молекулярной массы белка (масс-заряд m/z ; Да) и количество белка (интенсивность, %). Исследуемый спектр сопоставлялся в режиме «Идентификация» с коммерческой базой данных для определения показателя достоверных совпадений «Score»: значения 2.300-3.000 – указывает на высокую надежность идентификации вида; 2.000-2.299– на идентификацию рода и возможную идентификацию вида, значения 1700-1.999– на возможную идентификацию рода, менее 1.700– невозможность идентификации, в случае если этого микроорганизма нет в базе данных. Образцы с высоким показателем Score (2.300-3.000), импортировались в отдельные файлы создаваемой нами персонифицированной базы данных протеомов микроорганизмов Biotyper. Каждый протеомный образец паспортизировался с описанием биохимических и таксономических характеристик. Методика идентификации константных и переменных белков в масс-спектрах с помощью программ Biotyper, Flex Analysis и MS Excel. Проводился поиск сходства и отличия профилей молекулярных масс белков клеток, выделяя диапазоны m/z , где чаще всего группируются наиболее интенсивные белковые комплексы, обладающие определенной функцией, или имеющие таксономические значения.

Результаты исследования и их обсуждения

Впервые получена коллекция масс-спектрометрических профилей представителей *Vibrio cholerae* 140 штаммов различных биоваров, выделенных как от человека, так и из окружающей среды в разные годы и охарактеризованные по наличию генов токсигенности (ctx-/+). На основе коллекции создана и зарегистрирована база данных.

Компьютерному анализу подвергали масс-спектрометрические паспорта штаммов *V. cholerae* – 59 пртеома ctx⁺, 81 протеом – ctx⁻. Далее, проводился поиск одинаковых значений масс, среди полученных протеомов. Что, позволило обратить внимание на комплекс белков с молекулярной массой 3202 (+/-2) Da (Чайка и др., 2017, 2018). Определено количество истинно - и ложно -

положительных и отрицательных результатов нашей работы. В качестве истинно положительных результатов были взяты штаммы, имеющие ген токсигенности (ctx+), что подтверждалось ПЦР анализом, при наличии белка молекулярной массой (m/z) 3202 Да. Истинно отрицательные штаммы - с отсутствием гена ctx и белкового пика 3202 Да. Ложноположительными результатами считались профили штаммов содержащие пик 3202 Да при отсутствии гена токсигенности, ложноотрицательные же наоборот, имели ген токсигенности при отсутствии маркерного белка (табл.1.). Нами выявлено, что среди 59 протеомов ctx+, белок с массой 3202 Да встречался у 51 представителя, что составляет 86,4%, и только 8 протеомов (13,6%) не имели его. Среди группы атоксигенных паттернов (n=81) белковый пик с массой 3202 Да отсутствовал у 72 протеомов, что составило 88,9%, и только 9 - имели этот белковый пик (11,1%). Таким образом, только 17 протеомов из 140 (12%) не поддались принципу типирования масс-спектрометрическим методом. Откуда следует, что диагностическая ценность последнего, составляет 88 %. Чувствительность и специфичность метода выявления белка токсигенности холерных вибрионов масс-спектрометрическим методом также имеют высокие показатели 86,4% и 88,9% соответственно. Очевидно, что высокие показатели достоверности (p=0,021) принадлежности белка с молекулярной массы 3202Да к токсигенным вариантам, свидетельствуют о том, что наличие данного белка действительно является таксон-специфическим маркерным белком, характеризующим штамм *Vibrio cholerae*, как токсигенный. Соответственно отсутствие белка – указывает на атоксигенность штамма. Повысить диагностическую ценность предложенного нами теста может показатель количества белков (интенсивность).

Нами показано, что средний показатель интенсивности среди токсигенных паттернов (n=51) составил 65%, у 9 атоксигенных протеомов, где белковый пик встречался, как ложноположительный вариант средняя интенсивность пика составила - 22,4%. Из этого следует, что данный биохимический показатель необходимо учитывать при обнаружении протеомного пика с массой 3202Да.

Нами показано, что средний показатель интенсивности среди токсигенных паттернов (n=51) составил 65%, у 9 атоксигенных протеомов, где

белковый пик встречался, как ложноположительный вариант средняя интенсивность пика составила - 22,4%. Из этого следует, что данный биохимический показатель необходимо учитывать при обнаружении протеомного пика с массой 3202Da.

Таблица 1 Масс-спектрометрическая и генетическая характеристика токсигенности штаммов в количественном соотношении результатов исследования протеомов серогрупп и биоваров представителей *V. cholerae*

Генетическая характеристика протеомов	ctx + (n = 59)		ctx - (n = 81)	
	3202 Да +	3202 Да -	3202 Да -	3202 Да +
Наличие протеомного маркера токсигенности 3202Да				
Итоговая характеристика	Истинно положительные	Ложноотрицательные	Истинно отрицательные	Ложноположительные
Биовары / серогруппы	Кол-во / (%)		Кол-во / (%)	
<i>V.cholerae O1 classica</i>	2 / (100)	0 / (0)	0 / (0)	0 / (0)
<i>V.cholerae O1 El Tor</i>	19 / (82,6)	4 / (17,4)	42 / (91,3)	4 / (8,7)
<i>V.cholerae O139</i>	14 / (82,4)	3 / (17,6)	15 / (100)	0 / (0)
<i>V.cholerae non O1/O139</i>	16 / (94,1)	1 / (5,9)	15 / (75)	5 / (25)
Всего	140			
	51 / (86,4)	8 / (13,6)	72 / (88,9)	9 / (11,1)

Еще одним этапом нашей работы стало изучение различий между масс-спектрами гемолитических и негемолитических штаммов эшерихий (Гапон и др., 2010, 2015, 2016; Телесманич и др., 2015, 2016). Впервые нами была создана и зарегистрирована масс-спектрометрическая база данных белковых профилей представителей вида *Escherichia coli*. Показано, что основным различием между подгруппами гемолитических, негемолитических вариантов и ассоциантов является значение m/z с максимальным показателем количества белка (100%) (табл.2). Все протеомы гемолитические эшерихий (n=20) содержали в масс-спектрах белки в максимальном количестве (100%), с молекулярной массой, равной – 9064 Da, отсутствующий среди других групп в доминантном варианте.

Таблица 2 Разнообразие доминантных рибосомальных белков среди представителей *E. coli*

<i>E. coli</i> (Всего 144 штамма)	M/z пика с максимальной интенсивностью 100% (Да)	Кол-во штаммов, имеющие данный пик	
		Шт.	%
Негемолитические <i>E. coli</i> (109 протеомов)	5096 (±2)	1	0,9
	5381 (±2)	80	73,4
	5410 (±2)	1	0,9
	6255 (±2)	2	1,8
	9714 (±2)	25	23
Гемолитические <i>E. coli</i> (20 протеомов)	9064 (±2)	20	100
Негемолитические варианты <i>E. coli</i> , выделенные из ассоциации с условно- патогенными энтеробактериями родов <i>Klebsiella</i> и <i>Enterobacter</i> (15 протеомов)	5382 (±2)	7	46,7
	6258 (±2)	1	6,6
	9742 (±2)	7	46,7

Среди всех паттернов негемолитических протеомов (n=109), чаще всего детектировались белки с максимальной интенсивностью (100%), которые имели m/z 5381 Да, что составляет 73,4%. У 23% протеомов этой группы регистрировался масс-заряд со значением 9714 Да. Паттерны протеомов негемолитических эшерихий – ассоциантов (n=15) отличалась гетерогенностью по данному признаку. Так, почти половина (46,7 %) протеомов популяции имели максимальный белковый пик со значением 5382 Да (как у негемолитических). Столько же протеомов (46,7%) 100% - белковый пик с массой 9743, и только 6%, было отмечено 100% пиком с молекулярной массой (m/z) 6258 Да, который не имели другие группы в доминантном варианте.

Следующим этапом работы стало изучение масс-спектрометрическим методом протеомов бактериофага с чувствительной к нему клеткой, а также выявление и характеристика углеводсвязывающих рецепторных комплексов (Гончаренко и др., 2013; Телесманич и др., 2013, 2016; Чайка и др., 2016). С помощью биохимико-бактериологической модификации метода определения активности бактериофага на чашках Петри (метод Грациа в нашей модификации) мы установили, что углеводы по своей активности на бактериофаг E1 Тог разделялись на две группы: – 1) ингибирующие активность фага; - 2) не ингибирующие активность фага. Так, D-мальтоза и N-ацетил-D-глюкозамин не повлияли на активность фага. Что проявилось в виде

полноценной зоны лизиса фага. Сахароза, D-галактоза, L-арабиноза оказывали ингибирующее влияние на активность бактериофага. Активность бактериофага, проинкубированный с D-галактозой, L-арабинозой, был оценен на 2+. Максимальное ингибирующее действие сахарозы оценивалось в 3+. В то же время в контрольном образце (без углеводов) фаг проявлял 100% лизис по отношению к культуре *V. cholerae*, это, по всей видимости, свидетельствует о том, что рецепторы фага специфичные данным углеводам участвуют в механизме взаимодействия с микробной клеткой холерного вибриона. Сложность поставленных нами задач заключалась в том, что до настоящего времени отсутствовали методики снятия масс-спектра бактериофага при помощи метода MALDI-ToF. Необходимо было подобрать и адаптировать методику масс-спектрометрического профилирования не только для бактериофага, но и для провзаимодействовавшего фага с культурой, как в присутствии углеводов, так и без них. Нами было проведено биотипирование созданных паттернов фага и клетки, для оценки изменения их протеома. Из таблицы 3 видно, что внесенный в базу данных протеом бактериофаг узнавал сам себя с высокой степенью достоверности Score 2,845.

Таблица 3 Показатели Score изучаемых паттернов бактериофага и клетки

№ п/п	Исследуемый объект Объект в базе данных	Показатель Score (степень схожести с микроорганизмами в базе данных)
1	Фаг El Tor Фаг El Tor	2,845
2	<i>V.cholerae</i> El Tor <i>V.cholerae</i> El Tor	2,820
3	<i>V.cholerae</i> El Tor Фаг El Tor	0
4	<i>V.cholerae</i> +фаг El Tor Фаг El Tor	0,324
5	<i>V.cholerae</i> +фаг El Tor <i>V.cholerae</i> El Tor	2,449

Протеом холерного вибриона узнавал сам себя с высоким показателем Score чуть выше 2,820. Соотнесение белкового спектра холерного вибриона с внесенным в базу данных спектром молекулярных масс фага выдал Score с нулевым значением (Score=0). При сравнении масс-спектров смеси (фаг +

холерный вибрион) с протеомом монофага выдавалось очень низкое значение эффективности идентификации Score равное 0,324, свидетельствуя о том, что белковый профиль фага сильно меняется. Сохранение профиля молекулярных масс паттерна фаг + холерный вибрион с масс-спектром протеома холерного вибриона, показал значение Score 2,449, обозначая, что белковый профиль масс-зарядов клетки *V.cholerae* El Tor 18507 практически не изменяется.

Анализ молекулярных масс (m/z) протеома бактериофага El Tor в MSP-peak List показал, что белковый профиль его состоит из 70 белковых пиков разной интенсивности. Один доминантный комплекс белков 100% интенсивности, имел молекулярную массу (m/z) – 4373 Да. Интенсивность всех остальных комплексов белков фага составила 1 – 20%, лишь единичные были выше 20%. Это свидетельствует о том, что комплекс белков с молекулярной массой 4373 Да является основным для фага. Протеом чувствительного к фагу штамма *V.cholerae* El Tor 18507 был охарактеризован по 61 белковому комплексу (на графике 61 пик). Доминантным по количеству белков явился пик с молекулярной массой 4367 Да. Паттерн протеомов бактериофага El Tor и чувствительного к нему штамма (фаг + *V.cholerae* El Tor 18507) показал, что у полученного профиля определялось 70 белковых пиков, как и у масс-спектра *V.cholerae* El Tor 18507. Молекулярная масса доминантного пика белкового спектра смеси составила 4367,2 Да (100% интенсивность), как и в масс-спектре монопротеома холерного вибриона. Все основные пики общего профиля белков сохранились, но снизилось их количество (интенсивность). И появились новые пики с невысокой интенсивностью. Для детального изучения влияния «ингибирующих» углеводов на взаимодействие бактериофаг – клетка нами был выбран один из углеводов – сахароза, который наилучшим образом (3+) проявил себя в микробиологическом опыте, а также под его воздействием полностью исчезал доминантный пик фага – 4373 Да. Проведен сравнительный протеомный анализ воздействия сахарозы на взаимодействие бактериофага с клеткой на основе достоверных различий между белковыми профилями (Score), сопоставлении суммарных спектров и разбора изменения протеома в MSP-Peak List. Нас заинтересовала возможность выявления изменений в масс-спектрометрических профилях при различных сочетаниях в опыте: *V.cholerae* El Tor 18507 с сахарозой; бактериофаг El Tor с сахарозой; Бактериофаг El Tor +

V.cholerae El Tor 18507+ сахараза в сравнении со спектрами чистой культуры и бактериофага. При инкубации исследуемого штамма *V.cholerae* El Tor 18507 с сахарозой не наблюдалось значимого изменения картины основного спектра (рис.1). Таким образом, можно предположить, что сахараза в смеси культура-фаг вступает во взаимодействие именно с белковыми рецепторами фага, блокируя специфичные к холерному вибриону рецепторы, что в дальнейшем проявляется в резком снижении активности фага по отношению к чувствительному штамму. Что было нами показано ранее в микробиологических опытах.

Из рисунка 1 видно, что спектр *V.cholerae* El Tor 18507 с сахарозой в «числителе», практически не меняется по сравнению со спектром чистой культуры *V.cholerae* El Tor 18507 в «знаменателе», а Score демонстрирует высокую степень идентификации *V.cholerae* El Tor 18507– 2.380.

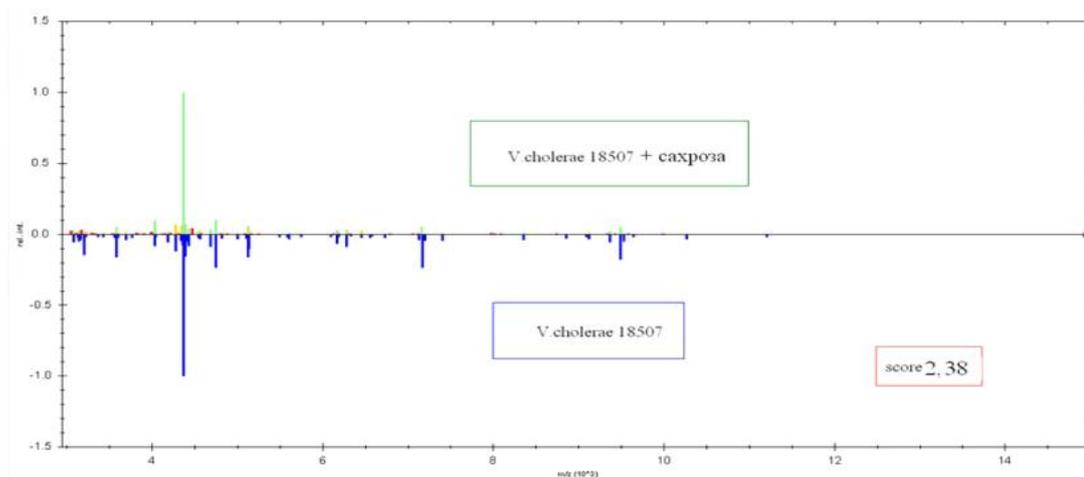


Рисунок 1. Сравнительный анализ основного спектра *V.cholerae* El Tor 18507 и протеома штамма проинкубированного с сахарозой *V.cholerae* El Tor 18507

Масс-спектры фага El Тор и культуры холерного вибриона, каждый из которых был проинкубирован с сахарозой, также были протипированы в сравнении с профилем бактериофага El Тор, внесенного в базу данных (таблица 5.). Из таблицы 4. видно, что при инкубации фага с сахарозой показатель эффективности идентификации Score бактериофага, резко падает от 2.845 до 0.973, переходя в разряд отсутствия идентификации, свидетельствуя о том, что бактериофаг значительно меняет свой протеомный профиль, становясь

«неузнаваемым» как для самого себя, так и чувствительной к нему культуре (рис. 2).

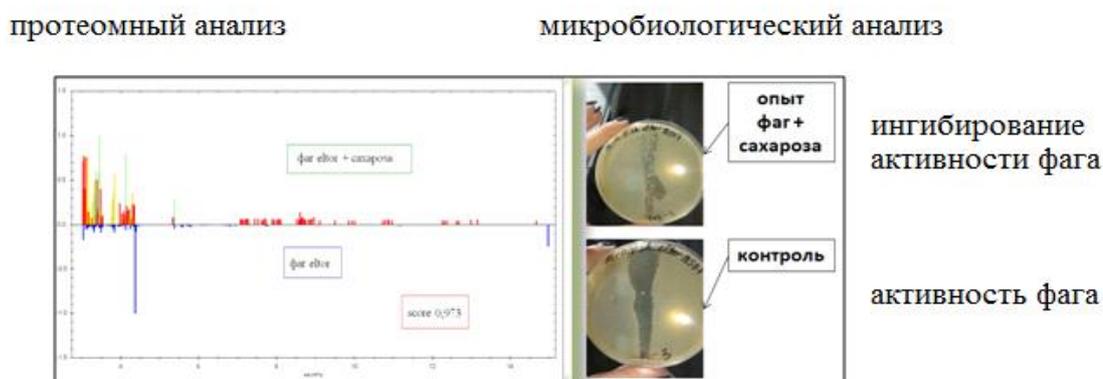


Рисунок 2. Сравнительный анализ основного спектра фага El Tor и проинкубированного с сахарозой фага El Tor .

В то время как чувствительный к нему штамм, при инкубировании с сахарозой, не меняет своего белкового состава. Таким образом, можно сделать вывод о том, что при взаимодействии лектиновых рецепторов бактериофага с углеводами на поверхности бактерии или с введенными в систему чистыми углеводами изменения происходят со стороны фага, что может происходить так же при употреблении сахара во время лечения бактериофагами. Изменения в биохимической структуре происходят со стороны бактериофага, а не бактерии (Гончаренко и др., 2013; Телесманич и др., 2013, 2016; Чайка и др., 2016).

Таблица 4. Изменение показателей Score фага El Tor и *V.cholerae* El Tor 18507, после инкубирования с сахарозой

№ п/п	Исследуемый объект	Показатель Score (степень схожести с м/ов базе данных)
	Объект в базе данных	
1	Фаг El Tor +сахароза	0,973
	Фаг El Tor	
2	<i>V.cholerae</i> +сахароза	2,380
	<i>V.cholerae</i>	
3	Фаг El Tor	2.845
	Фаг El Tor	
4	<i>V.cholerae</i>	2,820
	<i>V.cholerae</i>	

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что оценка интенсивности (количества) доминантных комплексов белков (пиков) позволяет дифференцировать серовары *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* не O1/O139. Спектр представителей O1 серогруппы классического биовара имеют 6 пиков (3202, 4370, 4746, 5123, 7168, 9493 Да), в то время как у вибриона El Tor наиболее интенсивными пиками в профиле были 4279, 4370, 4746, 5123, 6279, 7166, 9493 Да (± 2 Да). Профиль *V. cholerae* не O1/ не O139 в целом менее интенсивен – содержит один или два комплекса с большим количеством белка (50-100%), остальные представлены показателями ниже 50% значения.
2. Анализ молекулярных масс MSP - Peak List позволяет выявить отличия между строением протеома клеток внутри вида *V. cholerae* O1, определяя их таксономию в формате MALDI-TOF. *V. cholerae* El Tor имеют два мажорных пика 100% интенсивности – 7160Да и 5123 Да, *V. cholerae classica* – 2 мажорных пика – 7163Да и 3202 Да (± 2 Да).
3. Выявление таксон - специфического маркерного белкового пика м.м. 3202 Да, характеризует штамм *V. cholerae* как токсигенный (*ctx+*), его отсутствие – как атоксигенный (*ctx-*).
4. Масс-заряд с наибольшей интенсивностью пика (100%) в профиле *Escherichia coli* служит дифференциальным протеомным таксономическим признаком, по которому можно определить наличие гемолитических свойств. Доминантный комплекс белков в диапазоне молекулярных масс (m/z) 9063-9066 Да является маркером вирулентности (с положительной гемолитической активностью), для негемолитической популяции характерен другой максимальный протеомный комплекс, находящийся в диапазоне 5381-5410 Да.
5. Идентифицирован комплекс доминантных белков бактериофага El Tor (100%) интенсивности, имеющих молекулярную массу (m/z) 4373Да, которые являются лектиновыми рецепторами вириона, так как именно они исчезают из графика, в присутствии сахарозы, приводя к ингибированию его активности путем гликозилирования. При этом бактериофаг El Tor изменяет свой

протеомный профиль, становясь неузнаваемым, показатель идентификации Score бактериофага падает с 2.845 до значения 0.973.

6. При взаимодействии бактериофага El Tor и клетки *V. cholerae* El Tor 18507 изменение происходит со стороны бактериофага, а не чувствительной к нему клетки микроорганизма, о чем свидетельствует показатель эффективности идентификации Score – для бактериофага El Tor - 0.324, для *V. cholerae* El Tor 18507 - 2.440 определенные после их взаимодействия.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- Телесманич Н.Р., Агафонова В.В., Сеина С.О. [и др.] MALDI масс-спектрометрический анализ в типировании и внутривидовой дифференциации холерных вибрионов на основе создания референс – библиотеки протеомных профилей // Медицинский Вестник Юга России. – 2014. - №2. – Стр. 88-91.
- Гапон М.Н., Телесманич Н.Р., Терновская Л.Н., Чайка С.О. [и др.] Времяпролетная масс-спектрометрическая внутривидовая диагностика штаммов эшерихий, выделенных от человека // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016- Т.61, №6. – С.371-374.
- Телесманич Н.Р., Гончаренко Е.В., Чайка С.О. [и др.]. Возможности применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для изучения углеводов - специфических рецепторов диагностического бактериофага эльтор // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. - 2016. - №2. – Стр. 85-90.
- Чайка С.О., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М. Масс-спектрометрический маркер вирулентности *Vibrio cholerae* // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. - Т.63, №7. – Стр. 445-449.
- Чайка С.О., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М. MALDI-TOF масс-спектрометрическая идентификация маркера токсигенности *Vibrio cholerae* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2018. - №2. – Стр. 108-109.
- Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Чайка И.А. Линейная масс-спектрометрия клеточных белков // Обмен веществ при адаптации и повреждении - дни молекулярной медицины на Дону: материалы XVI Российской научно – практической конференции с международным участием (Ростов-на-Дону 12-13 мая 2017г) / под ред. З.И. Микашинович. – Ростов-на-Дону: ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. - 2017. - Стр. 76-79.

- Микашинович З.И., Телесманич Н.Р., Летуновский А.В., Саркисян О.Г., Харатян Т.Э, **Чайка С.О.** Структура и функции белков, аминокислот // Азотистый обмен: учебное пособие. Ростов-на-Дону: Изд-во РостГМУ, 2018. – 114с., утвержденное экспертной комиссией по работе с учебными изданиями ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М.Сеченова Минздрава России от 19 апреля 2018г. по области образования здравоохранение медицинские науки.
- Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2013620585, бюллетень №2 от 29.04.2013 г. «Белковые профили масс-спектров представителей вида *Vibrio cholerae* для программы MALDI Biotyper». Чайка И.А., Телесманич Н.Р., **Сеина С.О.**
- Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2016620877, бюллетень №7 от 28.06.2016. «Коллекция белковых профилей масс-спектров представителей вида *Escherichia coli* гемолитических и негемолитических штаммов выделенных от человека для программы Biotyper» Телесманич Н.Р., **Чайка С.О.**, Чайка И.А.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- НССА – α -циано-4-гидроксикоричной кислоты матрица для масс-спектрометрии (Bruker Daltonik)
- М/z – масс-заряд
- MALDI-ToF-MS – масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбции / ионизации (англ. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) с времяпролетным разделением ионов (англ. Time of Flight)
- MS – масс-спектрометрия
- MSHA - маннозочувствительные пили адгезии
- MSP-peak-list – масс-пик-лист
- Organic Solvent (OS) - основной органический растворитель
- TFA - Трифторуксусная кислота