

## Протеомные технологии в разработке новых вакцин на основе серотип-неспецифичных белковых антигенов *Streptococcus pneumoniae*

Юрий Александрович Тюрин<sup>1,2\*</sup>, Альбина Зуфаровна Зарипова<sup>1,2</sup>,  
Гузель Шавхатовна Исаева<sup>1,2</sup>, Ильшат Ганиевич Мустафин<sup>1</sup>,  
Ли́ра Табри́совна Баязитова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

<sup>2</sup>Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии  
и микробиологии, г. Казань, Россия

### Реферат

В обзоре представлена современная стратегия совершенствования средств вакцинопрофилактики стрептококковых инфекций, направленная на поиск и разработку новых вакцин для иммунизации людей, относящихся к группам риска. Необходимо отметить, что пневмококки (*S. pneumoniae*) относятся к представителям грамположительных бактерий (диплококков) и становятся основной причиной различных нозологических форм инфекционных заболеваний человека (таких, как пневмония, средние отиты, синуситы, бактериемия и менингиты). Существующие пневмококковые вакцины (конъюгатные и полисахаридные) имеют некоторые важные ограничения, например зависимость от серотипа, потеря эффективности из-за смены серотипового пейзажа, недостаточный защитный эффект от неинвазивных форм пневмококковых инфекций и высокие производственные затраты, связанные с разработкой этих препаратов. В основной части обзора освещены важнейшие исследовательские работы, в которых были использованы современные протеомные технологии в изучении протеомного профиля *S. pneumoniae*. Эти работы позволяют на молекулярном уровне оценить значимость бактериальных белков в качестве кандидатов для создания новых комбинированных вакцин, способных осуществлять эффективную защиту от всего многообразия серотипов пневмококков, циркулирующих в популяции человека. Так, в частности, приведены данные по новой методологии анализа протеома внеклеточных бактериальных микровезикул *S. pneumoniae* для идентификации иммунореактивных белковых антигенов, потенциальных кандидатов для включения в вакцины. В результате этих исследований было открыто 15 иммунореактивных белков, 7 из которых цитозольные, а 8 белков связаны с клеточной поверхностью (MalX, ABC-транспортер или субстрат, связывающий транспортный белок, AmiA, AliA, LysC, IgA1-протеаза, PspA и предполагаемый предшественник β-галактозидазы). Это возможные кандидаты для создания комбинированных вакцин. Дополнительно в обзоре представлены данные о роли значимых факторов вирулентности белковой природы штаммов *S. pneumoniae* в назофарингеальной колонизации, усилении инфекциозности, а также о преодолении реакций иммунного ответа организма хозяина.

**Ключевые слова:** комбинированные вакцины, бактериальный протеом, *S. pneumoniae*, протеины, адгезины, тандемная масс-спектрометрия, аффинная хроматография.

**Для цитирования:** Тюрин Ю.А., Зарипова А.З., Исаева Г.Ш. и др. Протеомные технологии в разработке новых вакцин на основе серотип-неспецифичных белковых антигенов *Streptococcus pneumoniae*. *Казанский мед. ж.* 2019; 100 (4): 680–688. DOI: 10.17816/KMJ2019-680.

### Proteomic technologies in the development of new vaccines based on serotype-non-specific protein antigens of *Streptococcus pneumoniae*

Yu.A. Tyurin<sup>1,2</sup>, A.Z. Zaripova<sup>1,2</sup>, G.Sh. Isaeva<sup>1,2</sup>, I.G. Mustafin<sup>1</sup>, L.T. Bayazitova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

<sup>2</sup>Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia

**Abstract**

The review presents a modern strategy to improve the means of vaccine prevention of streptococcal infections aimed at finding and developing new vaccines for immunization of people belonging to risk groups. It should be noted that pneumococci (*S. pneumoniae*) are members of gram-positive bacteria (diplococci) and become the main cause of various nosological forms of human infectious diseases (such as pneumonia, otitis media, sinusitis, bacteremia and meningitis). Existing pneumococcal vaccines (conjugate and polysaccharide) have some important limitations, for example, serotype dependence, loss of effectiveness due to a change in the serotype landscape, insufficient protective effect from non-invasive forms of pneumococcal infections and high production costs associated with the development of these products. The main part of the review presents the most important research papers that used modern proteomic technologies in the study of the *S. pneumoniae* proteomic profile. These works allow us to evaluate at the molecular level the importance of bacterial proteins as candidates for creating new combination vaccines that can effectively protect against the full range of pneumococcal serotypes circulating in the human population. So, in particular, the data are provided on the new methodology for the analysis of the proteome of extracellular *S. pneumoniae* bacterial microvesicles to identify immunoreactive protein antigens, potential candidates for inclusion into vaccines. As a result of these studies, 15 immunoreactive proteins were discovered, 7 of which are cytosolic and 8 proteins are bound to the cell surface (MalX, ABC transporter or substrate binding transport protein, AmiA, AliA, LytC, IgA1 protease, PspA and the putative precursor of  $\beta$ -galactosidase). These are possible candidates for developing combination vaccines. Additionally, the review presents data on the role of significant virulence factors of the protein nature of *S. pneumoniae* strains in nasopharyngeal colonization, increased infectivity, as well as on overcoming reactions of the host's immune response.

**Keywords:** combined vaccines, bacterial proteome, *S. pneumoniae*, proteins, adhesins, tandem mass spectrometry, affinity chromatography.

**For citation:** Tyurin Yu.A., Zaripova A.Z., Isaeva G.Sh. et al. Proteomic technologies in the development of new vaccines based on serotype-non-specific protein antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Kazan medical journal*. 2019; 100 (4): 680–688. DOI: 10.17816/KMJ2019-680.

Пневмококки (*S. pneumoniae*) относятся к представителям грамположительных бактерий (диплококков) и становятся основной причиной различных нозологических форм инфекционных заболеваний человека (таких, как пневмония, средние отиты, синуситы, бактериемия и менингиты).

Данный вид грамположительных бактерий с 90-х годов прошлого века и по настоящее время остаётся предметом многочисленных клинических исследований в области микробиологии, инфектологии и молекулярной биологии, многие из которых сосредоточены на изучении механизмов реализации бактериальной вирулентности [1–3].

Необходимо отметить, что колонизация носоглотки *S. pneumoniae* развивается, как правило, у детей в возрасте от 2 до 3 лет жизни, а транзитными носителями этого вида могут быть более 50% детей дошкольного возраста, при этом в популяции у взрослых носительство менее распространено и составляет менее 10% [4, 5].

Бессимптомное носоглоточное носительство *S. pneumoniae* в определённых условиях повышает риск развития инвазивных форм стрептококковых инфекций человека [6, 7]. В связи с этим доля инфекций, в частности пневмоний, вызванных *S. pneumoniae*, возрастает в группах риска: люди пожилого возраста, дети раннего

возраста и пациенты с различными формами иммунодефицитов [8, 9].

Бессимптомное носительство и развитие инвазивных форм пневмококковой инфекции детерминировано группой факторов вирулентности, в том числе и наличием полисахаридной капсулы. Играет основную роль в защите микроорганизма от фагоцитоза, способствует колонизации назофарингеального эпителия именно полисахаридная капсула пневмококка [10].

Уменьшение размера капсулы может приводить к открытию поверхностных белковых структур, что опосредует адгезию к респираторному эпителию и способствует дальнейшей колонизации и инвазии *S. pneumoniae* [11]. Репрессия генов, ответственных за образование капсулы и объединённых в один кластер — *cps*-локус, приводит к потере защитного слизистого слоя [12]. Следствием мутации или делеции *cps*-генов может стать образование некапсулированных штаммов *S. pneumoniae*, у которых потеря капсулы замещается приобретением других компенсаторных механизмов.

Этот процесс может быть обусловлен экспрессией поверхностного белка-адгезина *PspK*, который кодируется геном *pspK*, заменяющего *cps*-ген и описанного у некапсулированных штаммов. *PspK*, возможно, принимает участие в адгезии некапсулированных вариантов

пневмококков на клетках эпителия дыхательных путей хозяина и колонизации носоглотки, но окончательно эти механизмы не установлены. Кроме того, с белком PspK связано повышение вирулентности некапсулированных пневмококков за счёт нейтрализации секреторного иммуноглобулина (Ig) класса А назофарингеального эпителия [13, 14].

Дополнительным механизмом повышения вирулентности инкапсулированных штаммов пневмококков может быть усиление образования биоплёнок в сравнении с капсулированными [15]. Как известно, ген *cspE* кодирует глюкозотрансферазу — фермент, катализирующий первый этап синтеза капсулы.

В этом контексте примечательно, что приобретение инкапсулированным вариантом пневмококка серотипа 18С мутации в гене *cspE* ассоциировано с увеличением экспрессии шести генов, участвующих в связывании дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), в 11–34 раза по сравнению с «диким» капсулированным вариантом [16]. Помимо участия в формировании биоплёнки, увеличение экспрессии этих генов связано с усилением клеточного роста, увеличением адгезии к эпителиальным клеткам носоглотки и повышенной способностью к генетической трансформации, что может лежать в основе повышения антибиотикорезистентности у некапсулированных штаммов пневмококков.

Современная стратегия профилактики и лечения пневмококковой инфекции у человека основана на использовании антибиотиков и средств вакцинопрофилактики [17].

Применение антибиотиков стимулировало рост выделяемых от человека антибиотикорезистентных изолятов *S. pneumoniae*, что привело к селекции клональных типов *S. pneumoniae*, которые устойчивы к β-лактамам и макролидам [18, 19]. Распространение антибиотикорезистентных клонов *S. pneumoniae* закономерно приводит к повышению стоимости лечения и, как правило, увеличивает бюджетные затраты системы здравоохранения [20].

В связи с этим получила развитие стратегия, направленная на совершенствование средств вакцинопрофилактики стрептококковых инфекций, что стимулирует поиск и разработку новых вакцин для иммунизации людей, относящихся к группам риска [21, 22]. Существующие пневмококковые вакцины (конъюгатные и полисахаридные) имеют некоторые важные ограничения, такие как зависимость от серотипа, потеря эффективности из-за смены серотипового пейзажа, недостаточный защитный эффект от неинва-

зивных форм, в частности от острого среднего отита, и высокие производственные затраты, связанные с разработкой этих препаратов.

В настоящее время идентифицировано более 90 различных серотипов пневмококков. При этом состав современных вакцин ограничивается теми серотипами, которые наиболее часто ассоциируются с инвазивными формами пневмококковой инфекции [23, 24]. Согласно последним данным эпидемиологических исследований, после включения пневмококковых вакцин в национальные программы иммунизации детей развитых и развивающихся стран происходят увеличение иммунной прослойки и формирование коллективного иммунитета среди детского населения, а также дополнительной защиты от пневмококковой инфекции среди взрослых.

Несмотря на несомненное влияние вакцинации на снижение инвазивных форм пневмококковой инфекции во всех возрастных группах вакцинированных и невакцинированных, есть данные об увеличении частоты колонизации носоглотки невакцинированными и нетипируемыми, в том числе и инкапсулированными штаммами пневмококков, — приблизительно до 3–19% случаев бессимптомного носительства [12]. Учитывая возможные угрозы, связанные с колонизацией невакцинированными и инкапсулированными вариантами пневмококков биотопа верхних дыхательных путей, ассоциированными с развитием неинвазивных и инвазивных форм, хотя и на более низком уровне в сравнении с вакцинными штаммами, существует необходимость разработки вакцин нового поколения имеющих более широкий защитный спектр [25].

Перспективны исследования по разработке альтернативных вакцин, содержащих иммуногенные протеины, адгезины или другие факторы вирулентности, общие для капсулированных и некапсулированных (нетипируемых) штаммов пневмококков (табл. 1).

Предполагают, что разработка новых вакцин на основе белковых компонентов пневмококка сможет преодолеть эти проблемы, открывая возможность более широкого протективного эффекта от инвазивных и неинвазивных форм пневмококковой инфекции, не связанного с конкретным серотипом [27].

В представленном обзоре показаны основные направления исследований бактериального протеома *S. pneumoniae*, которые позволяют на молекулярном уровне оценить значимость бактериальных белков — в качестве кандидатов для создания новых комбинированных вакцин,

Таблица 1. Новые факторы вирулентности пневмококков белковой природы [26]

Факторы вирулентности	Функции	Значение
Тромбоцит-связывающий белок клеточной стенки, фаг-опосредованный (Pb1B)	Приадгезивные свойства, связывание с галактозосодержащими рецепторами эпителия лёгких	Участие в назофарингеальной колонизации
Протеин клеточной стенки (DiiA)	Приадгезивные свойства, связывание с коллагеном и лактоферрином	Участие в назофарингеальной колонизации и диссеминации
$\beta$ -Гексозаминидаза клеточной стенки (GH2OC)	Участие в обмене веществ путём превращения гексозаминидов (сахаров) из гликанов хозяина	Способствует росту и персистенции
6-Фосфо- $\beta$ -глюкозидаза клеточной мембраны (Bg1A3)	Преобразование фосфорилированных субстратов в питательные моносахариды	Способствует выживанию и повышению вирулентности
Гемоглобин-связывающий белок клеточной стенки (Sprbhp-37)	Получение ионов железа	Способствует усилению инфекциозности
Фактор элонгации Tu (Tuf) — протеин с двойной локализацией на цитоплазматической и поверхностной клеточной мембране	Связывание и инактивация системы комплемента	Уход от иммунного ответа
Белок-переносчик полиаминов (potABCD)	Способствует усвоению полиаминов, которые защищают от активных форм кислорода, и способствует образованию биоплёнки	Уход от иммунного ответа
L-аскорбат-6-фосфатлактоназа — белок с локализацией в клеточной мембране	Очень консервативный фермент с $\beta$ -металлолактамазной активностью	Возможное участие в резистентности к $\beta$ -лактамным антибиотикам

способных осуществлять эффективную защиту от всего многообразия серотипов пневмококков, циркулирующих в человеческой популяции.

Для полноценного развития протеомных исследований *S. pneumoniae* необходимы доступность и детальное исследование структуры генома этого микроорганизма.

В настоящее время получены многочисленные данные о полной нуклеотидной последовательности генома *S. pneumoniae*. Впервые геном штамма *S. pneumoniae* TIGR4 (вирулентный изолят, серотип 4) был описан в работе Tettlin и соавт. [28, 29]. Геном типового изолята *S. pneumoniae* включает до 2 млн пар азотистых оснований ДНК с предсказанными открытыми рамками считывания (*ORF*) для кодирования 2236 белков, из которых более 60% были с определённой биологической функцией [28]. После публикации полных последовательностей генома типового штамма *S. pneumoniae* TIGR4 были опубликованы данные о других геномах штаммов *S. pneumoniae*, в том числе и инкапсулированных авирулентных изолятов (штаммы R6 и D39, серотип 2) [30–33].

В целом для генома *S. pneumoniae* характерны выраженное разнообразие и высокая

степень изменчивости с наличием транспозонов, вставочных элементов и сайт-специфических интеграз и рекомбиназы [34]. В работе R. Brückner и соавт. показано, что около 10% генов этого вида характеризуется значительными различиями в нуклеотидной последовательности между клиническими изолятами и типовым изолятом *S. pneumoniae*, которые обусловлены гибридизацией и высоким уровнем рекомбинаций между изолятами [35, 36]. Примечательно, что многие события рекомбинации затрагивают гены, кодирующие основные поверхностные антигены *S. pneumoniae*, значимые в патогенезе стрептококковых инфекций и иммунном ответе [36].

Анализ генома типового штамма *S. pneumoniae* R6 существенно расширил арсенал генов, связанных с вирулентностью. Это не только открытые ранее гены (*PspA*, *PsaA*, *CbpA*, пневмолизин), но и значительное количество генов, кодирующих белки с предсказанной локализацией на клеточной поверхности пневмококков [30, 37]. В эту новую группу не отнесены гены, кодирующие нетипичные поверхностные белки, такие как белки «домашнего хозяйства», цитозольные ферменты, которые не содержат

в своём составе сигнальной последовательности и мембранно-закрепляющих доменов [38].

*Роль геномного анализа в выборе белков-кандидатов для создания вакцин.* Скрининг *in silico* всего генома *S. pneumoniae* — подход для выбора белков-кандидатов для вакцины, основанный на биоинформационных алгоритмах, позволяющих определять специфические последовательности ORF, что продемонстрировано в ряде исследований [39, 40]. Экспонированные на поверхности клетки или секретлируемые белки идентифицируют путём сканирования последовательностей генома отдельного патогенного изолята или «пангенома» патогенного вида с использованием биоинформационных алгоритмов. Эти идентифицированные последовательности проверяют на наличие характерных специфических признаков, указывающих на возможную локализацию белка (секреторные мотивы, поверхностный «якорь», мембранные домены).

Скрининг *in silico* позволяет генерировать рекомбинантные белковые антигены, которые в последующем анализируют на иммуногенность. Такой подход стал революционным и открыл ряд потенциальных белков-кандидатов для создания потенциальных вакцин от *S. pneumoniae*-инфекции. В работе Wizemann и соавт. было идентифицировано 6 ранее неизвестных белковых антигенов *S. pneumoniae* (Sp36, Sp46, Sp91, Sp101, Sp128 и Sp130), которые индуцировали протективный иммунный ответ от пневмококковой инфекции у мышей [39]. Однако у данного подхода, есть существенные недостатки:

1) высокая трудоёмкость (требует экспрессии и скрининга сотен рекомбинантных белков);

2) могут быть пропущены белковые антигены, в которых отсутствуют классические признаки бактериальных поверхностных белков, указанные в биоинформационном скрининге.

*Протеомный анализ в выборе белков-кандидатов для создания вакцин.* Протеомика — область науки, занимающаяся системным исследованием структуры, функций, активности белков, а также белок-белковых взаимодействий, установлением уровня экспрессии генов [41]. Потенциальные белковые мишени для создания вакцины были определены на основе их антигенности с использованием для выделения выделяемых *in vitro* белков *S. pneumoniae* методом двухмерного электрофореза в полиакриламидном геле (2D-PAGE) и иммуноблоттинга с антисывороткой животного. При проведении этих исследований антисыворотку получали путём иммунизации животных

препаратом секретлируемого белка. Проверка предполагаемых вакцинных белков-мишеней обычно требует подтверждения их иммуногенности, которое осуществляют в виде скрининга с сывороткой человека-реконвалесцента (после перенесённой стрептококковой инфекции) либо с сывороткой лабораторных животных, иммунизированных рекомбинантными бактериальными белками.

В результате этих исследований у *S. pneumoniae* было выявлено до 54 иммуногенных белковых зон, из них 23 белка было идентифицировано с помощью технологии жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Из них 6 представлено очень интенсивно, это, прежде всего, такие белки, как Sphtra, NagA, Gsp-781, PhtD, ZmpB и Eno. К цитозольным из них отнесены NagA и Eno, а к мембранным или внеклеточным — Sphtra, Gsp-781, PhtD, ZmpB.

В дальнейшем различные протеомные подходы были сосредоточены на поиске белков-антигенов клеточной стенки *S. pneumoniae* как значимых мишеней для иммунного ответа и соответственно подходящих кандидатов для вакцин [42].

Необходимо отметить, что белки клеточной стенки пневмококков играют ключевую роль в физиологии микроорганизма, а также служат важными потенциальными мишенями для поиска белков-кандидатов для создания вакцин. В типовом штамме *S. pneumoniae* TIGR4 открыто 80 белков, содержащих классические последовательности (мотивы) для фиксации на клеточной поверхности, в штамме R6 их 65 [37]. К хорошо изученным поверхностным протеинам типовых лабораторных штаммов *S. pneumoniae* относят «анкерные» белки, подтверждённые при анализе генома, а также липопротеины (42 белка в штамме R6 и 47 в TIGR4), холин-связывающие белки (13 в R6 и 15 в TIGR4) и белки с мотивом LPXTG (13 в R6 и 19 в TIGR4), которые связаны с ферментом клеточной стенки сортазой [37].

Ниже представлены основные методические приёмы извлечения, анализа и идентификации белков клеточной стенки пневмококка и проверки их иммуногенности — как потенциальных кандидатов для создания вакцин.

*Извлечение белков клеточной стенки и мембраны при обработке интактных клеток лизоцимом и мутанолизинном и их фракционирование.* Предложен подход, основанный на извлечении фракций белков от неповреждённой клеточной стенки и мембраны бактерий химическими реагентами или ферментами (лизоци-

мом или мутанолизинном) в изотоническом буфере [43].

Полученные белковые экстракты анализировали методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (2D-PAGE), а белки идентифицировали масс-спектрометрическим анализом пептидных фрагментов после предварительного трипсинолиза. Используя данный методический подход, Morsczeck и соавт. идентифицировали более 200 белков *S. pneumoniae*, связанных с клеточной стенкой. Из них 5 были выбраны в качестве кандидатов для создания вакцин, среди этих белков особую значимость показали липоат-протеин-лигаза (Lpl) и ClpP-протеаза [44].

В аналогичном иммунопротеомном исследовании при скрининге 150 белков клеточных стенок *S. pneumoniae* было выявлено 17 иммуногенных белков, а 2 белка фермента гликолиза (фруктоза-бисфосфат-альдолаза и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа) были предложены как возможные вакцинные кандидаты [45].

*Селективная предварительная маркировка белков клеточной стенки и мембраны с помощью биотинилирующих агентов.* Используя селективную маркировку белков клеточной стенки на интактных бактериальных клетках с помощью биотинилирующих агентов [46, 47], очищенных методом аффинной хроматографии при разделении в формате одномерного или двумерного гель-электрофореза, с последующей идентификацией масс-спектрометрией, Cole и соавт. идентифицировали 33 иммунореактивных белка клеточной стенки *Streptococcus pyogenes*, реагирующих с сывороткой крови реконвалесцентов импетиго (GAS-ассоциированное импетиго) [48].

Однако при использовании методов субклеточного фракционирования белков клеточной поверхности неизбежно происходит «загрязнение» цитозольными белками, а анализ с применением двумерного гель-электрофореза не всегда оптимален для этих белков, так как содержание их в образце бывает очень низким [49]. По этой причине для устранения таких недостатков были предложены «безгелевые» методы анализа протеома.

*Идентификация белков клеточной стенки S. pneumoniae, основанная на «срезании» (shaving) экспонируемых поверхностных белковых доменов и пептидов живых бактериальных клеток.* Данный подход реализуется при обработке протеазами, такими как трипсин или протеиназа K, в условиях, которые сохраняют целостность клетки. Устойчивость грамположительных бактерий к протеолизу делает

этот подход полезным для селективной идентификации поверхностно-экспонированных белков *S. pneumoniae*. Пептиды, полученные в результате срезания (shaving), фракционируют с помощью двумерной жидкостной хроматографии и идентифицируют тандемной масс-спектрометрией.

Этот методический подход был впервые применён в работе Olaya-Abril и соавт., где были идентифицированы экспонируемые поверхностные белки из 16 клинических изолятов 9 различных серотипов *S. pneumoniae* [50]. Всего в этой работе было идентифицировано 254 протеина, которые включали большинство защитных антигенов, известных на сегодняшний день. Для половины клинических изолятов было характерно 32 идентифицированных белка. Из них 4 белка (Spr0012, Spr0328, Spr0561 и SP670\_2141) были впервые идентифицированы как поверхностные антигены с выраженной иммуногенностью (реагировали с сыворотками реконвалесцентов). Однако значимость иммунного ответа к этим белкам пневмококка на мышинной модели пневмококковой инфекции не проверяли.

Другая стратегия поиска новых вакцинных кандидатов среди поверхностных бактериальных белков, которая впервые была реализована для грамотрицательных бактерий, — анализ протеома внеклеточных бактериальных микровезикул (Outer Membrane Vesicles — OMV), отделяемых от клеток. Внеклеточные мембранные везикулы синтезируются многими грамположительными бактериями, в том числе *S. pneumoniae*, хотя очень мало известно об их биогенезе и механизме высвобождения [51, 52].

В работе Olaya-Abril была разработана методология анализа протеома OMV *S. pneumoniae* для идентификации иммунореактивных белковых антигенов, потенциальных кандидатов для включения в вакцины [52]. Проведённый анализ белка OMV (Outer Membrane Vesicles) 5 штаммов *S. pneumoniae* (R6, серотип 2; ST1, серотип 1; ST6B, серотип 6B; ST8, серотип 8 и ST23F) с применением анализа MALDI-TOF/TOF и с сыворотками человека позволил выявить в общей сложности 15 иммунореактивных белков, из которых 7 белков признаны цитозольными, а 8 белков (MalX, ABC-транспортер, или субстрат, связывающий транспортный белок, AmiA, AliA, LytC, IgA1-протеаза, PspA и предполагаемый предшественник β-галактозидазы с поверхностной локализацией) были связаны с клеточной поверхностью.

Альтернативные стратегии поиска возможных кандидатов среди белков *S. pneumoniae*

для создания вакцин основаны на функциональности белка антигена в патогенезе инфекции и его влиянии на иммунный ответ. Данный подход реализован в работе Moffitt и соавт. [53], где исследователи сфокусировали своё внимание на белковом профиле во время фазы колонизации инфекции.

Защита хозяина во время колонизации частично обеспечена CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитами, секретирующими интерлейкин-17А (клетки Th17). Библиотека экспрессии, полученная из генома *S. pneumoniae*, была подвергнута скринингу на белки, распознаваемые иммунными клетками Th17-лимфоцитами. Биоинформационный анализ определял приоритетные экспрессируемые белки, кодируемые генами с высокой гомологией между различными серотипами *S. pneumoniae*. Были установлены 5 возможных антигенов-кандидатов (SP0148, SP2108, SP0882, SP1634 и SP0314.1), которые тестировали на способность вызывать иммунный ответ у мышей. Полученные результаты тестирования показали, что только 2 антигена (SP2108 и SP0148) обеспечивают защитный Th17-иммунный ответ лимфоцитов, которые выделяют интерлейкин-17А. Подобные исследования были проведены при скрининге белков, полученных из бактериальных лизатов [54]. В результате высказано предположение, что защитные антигены, выявленные в ходе этих исследований, могут составить основу будущей пневмококковой вакцины [53, 54].

Таким образом, современные технологии анализа протеома и дополнительные биоинформационные стратегии открывают для исследователей в этой области хорошие перспективы в разработке современных эффективных вакцин. Однако для создания универсальной и эффективной вакцины, защищающей от стрептококковой инфекции, на современном этапе осуществляют поиск возможных комбинаций антигенов, идентифицированных с применением различных технологических подходов [55].

Прежде всего, это связано с высокой изменчивостью экспрессии антигенов различными серотипами пневмококка [29]. В случае *S. pneumoniae* показано, что комбинация пневмолизина, PspA и CbpA — одна из наиболее перспективных для включения в состав вакцины [55]. Протеомные методы исследования играют ключевую роль в выявлении новых поверхностно-ассоциированных белков, потенциальных антигенов для создания вакцин [56]. Эти исследования преимущественно сфокусированы на белках, которые связаны с клеточной поверхностью *S. pneumoniae*, а также секрети-

руются микробной клеткой и взаимодействуют с иммунной системой организма хозяина, вызывая целенаправленный иммунный ответ.

Протеомный анализ дополняет геномные подходы, предоставляя недоступную геномным методам информацию, такую как место локализации белка в микробной клетке, межбелковые взаимодействия, посттрансляционные модификации. По сравнению с существующими полисахаридными пневмококковыми вакцинами белковые вакцины имеют ряд преимуществ, в том числе более высокую иммуногенность [57].

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Сидоренко С.В. Пневмококковые инфекции снова в центре внимания. *Вопр. соврем. педиатрии*. 2009; 8 (3): 82–87. [Sidorenko S.V. Pneumococcal infection – in the centre of attention again. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2009; 8 (3): 82–87. (In Russ.)]
2. Лобзин Ю.В., Сидоренко С.В., Харит С.М. и др. Серотипы *Streptococcus pneumoniae*, вызывающие ведущие нозологические формы пневмококковых инфекций. *Ж. инфектол.* 2013; 5 (4): 36–42. [Lobzin Y.U., Sidorenko S.V., Kharit S.M. et al. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing major pneumococcal infections. *Zhurnal infekologii*. 2013; 5 (4): 36–42. (In Russ.)]
3. Austrian R. The pneumococcus at the millennium: not down, not out. *J. Infect. Dis.* 1999; 179 (2): S338–S341. DOI: 10.1086/513841.
4. Raman R., Sankar J., Putlibai S., Raghavan V. Demographic profile of healthy children with nasopharyngeal colonization of *Streptococcus pneumoniae*: A research paper. *Indian J. Med. Microbiol.* 2017; 35 (4): 607–609. DOI: 10.4103/ijmm.IJMM\_15\_347.
5. Smith H.C., German E., Ferreira D.M., Rylance J. Nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* in malnourished children: a systematic review and meta-analysis of prevalence. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2019; (9). DOI: 10.1093/trstmh/try139.
6. Simell B., Auranen K., Kayhty H. et al. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev. Vaccines*. 2012; 11 (7): 841–855. DOI: 10.1586/erv.12.53.
7. Мартынова А.В. Анализ заболеваемости инвазивными и неинвазивными нозологическими формами пневмококковых инфекций в различных группах населения. *Вестн. Рос. гос. мед. ун-та*. 2008; (5): 38–40. [Martynova A.V. Analysis of morbidity of invasive and non-invasive nosological forms of pneumococcal infections in different population groups. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2008; (5): 38–40. (In Russ.)]
8. Ряпис Л.А., Брико Н.И. Проблема пневмококковых инфекций в России. *Эпидемиол. и инфекц. бол.* 2010; (1): 4–8. [Ryapis L.A., Briko N.I. Problem of pneumococcal infections in Russia. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni*. 2010; (1): 4–8. (In Russ.)]
9. Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Чазова Т.А. и др. Внебольничные пневмонии пневмококковой этиоло-

гии и микробиологические аспекты назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* у детей в республике Татарстан. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7 (3): 271–278. [Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Chazova T.A. et al. Community-acquired pneumonia pneumococcal etiology and microbiological aspects of nasopharyngeal carriage in children in the Republic of Tatarstan. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7 (3): 271–278. (In Russ.)]. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-3-271-278.

10. Зарипова А.З., Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф. и др. Фенотипические и генотипические свойства *Streptococcus pneumoniae* при бактерионосительстве. *Практ. мед.* 2018; 16 (9): 106–112. [Zaripova A.Z., Bayazitova L.T., Tyupkina O.F. et al. Phenotypic and genotypic properties of *Streptococcus pneumoniae* in case of bacteria carrying. *Prakticheskaya meditsina*. 2018; 16 (9): 106–112. (In Russ.)] DOI: 10.32000/2072-1757-2018-9-106-112.

11. Park I.H., Kim K., Andrade A.L. et al. Nontypeable pneumococci can be divided into multiple cps types, including one type expressing the novel gene *pspK*. *MBio*. 2012; 3 (3): pii: e00035–12. DOI: 10.1128/mBio.00035-12.

12. Keller L.E., Robinson D.A., McDaniel L.S. Non-encapsulated *Streptococcus pneumoniae*: emergence and pathogenesis. *MBio*. 2016; 7 (2): e01792. DOI: 10.1128/mBio.01792-15.

13. Keller L.E., Jones C.V., Thornton J.A. et al. PspK of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to epithelial cells and enhances nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* 2013; 81 (1): 173–181. DOI: 10.1128/IAI.00755-12.

14. Keller L.E., Bradshaw J.L., Pipkins H., McDaniel L.S. Surface proteins and pneumolysin of encapsulated and nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* mediate virulence in a chinchilla model of otitis media. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2016; (6): 55. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00055.

15. Moscoso M., García E., López R. et al. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J. Bacteriol.* 2006; 188 (22): 7785–7795. DOI: 10.1128/JB.00673-06.

16. Schaffner T.O., Hinds J., Gould K.A. et al. A point mutation in *cpsE* renders *Streptococcus pneumoniae* non-encapsulated and enhances its growth, adherence and competence. *BMC Microbiol.* 2014; 14: 210. DOI: 10.1186/s12866-014-0210-x.

17. Федосеенко М.В., Намазова-Баранова Л.С. Международный опыт применения пневмококковых конъюгированных вакцин: проблемы, достижения, перспективы. *Вопр. современной педиатрии*. 2009; 8 (1): 130–134. [Fedoseenko M.V., Namazova-Baranova L.S. International experience of administration of pneumococcal conjugated vaccines: problems, progress, perspectives. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2009; 8 (1): 130–134. (In Russ.)]

18. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Катосова Л.К. Серотиповое разнообразие и резистентность пневмококков. *Вестн. Рос. АМН*. 2014; 69 (7–8): 38–45. [Mayanskiy N.A., Alyab'eva N.M., Lazareva A.V., Katosova L.K. Serotype diversity and antimicrobial resistance of streptococcus pneumoniae. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2014; 69 (7–8): 38–45. (In Russ.)].

19. Torres A., Blasi F., Peetermans W.E. et al. The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 33 (7): 1065–1079. DOI: 10.1007/s10096-014-2067-1.

20. Picazo J.J. Management of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections and the use of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 15 (3): 4–6. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02723.x.

21. Брико Н.И., Цапкова Н.Н., Сухова В.А. и др. Эпидемиологическая оценка первых результатов национальной программы иммунизации детей раннего возраста против пневмококковой инфекции в России. *Эпидемиол. и вакцинопрофил.* 2017; (5): 16–21. [Briko N.I., Tsapkova N.N., Sukhova V.A. et al. Epidemiological assessment of the first results of the national program of immunization of young children against pneumococcal infection in Russia. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2017; (5): 16–21. (In Russ.)]

22. McDaniel L.S., Swiatlo E. Pneumococcal disease: pathogenesis, treatment, and prevention. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 2004; 12: 93–98. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61114-4.

23. Feldman C., Anderson R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines. *J. Infect.* 2014; 69 (4): 309–325. DOI: 10.1016/j.jinf.2014.06.006.

24. Geno K.A., Gilbert G.L., Song J.Y. et al. Pneumococcal capsules and their types: Past, present, and future. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28 (3): 871–899. DOI: 10.1128/CMR.00024-15.

25. Varghese R., Jayaraman R., Veeraraghavan B. Current challenges in the accurate identification of *Streptococcus pneumoniae* and its serogroups/serotypes in the vaccine era. *J. Microbiol. Methods*. 2017; 141: 48–54. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.07.015.

26. Feldman C., Andersen R. Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus. *F1000Research*. 2016; 5: 2320. DOI: 10.12688/f1000research.9283.1.

27. Pichichero M.E., Khan M.N., Xu Q. Next generation protein based *Streptococcus pneumoniae* vaccines. *Hum. Vaccines Immunotherap.* 2016; (12): 1. DOI: 10.1080/21645515.2015.1052198.

28. Tettelin H., Nelson K.E., Paulsen I.T. et al. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*. 2001; 293 (5529): 498–506. DOI: 10.1126/science.1061217.

29. Bricker A.L., Camilli A. Transformation of a type 4 encapsulated strain of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; 172 (2): 131–135. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13460.x.

30. Hoskins J., Alborn W.E.Jr., Arnold J. et al. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* 2000; 183 (19): 5709–5717. DOI: 10.1128/JB.183.19.5709-5717.2001.

31. Lanie J.A., Ng W.L., Kazmierczak K.M. et al. Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J. Bacteriol.* 2007; 189 (1): 38–51. DOI: 10.1128/JB.01148-06.

32. Williams T.M., Loman N.J., Ebruke C. et al. Genome analysis of a highly virulent serotype 1 strain of *Streptococcus pneumoniae* from West Africa. *PLoS ONE*. 2012; 7 (10): e26742. DOI: 10.1371/journal.pone.0026742.

33. Choi S.C., Parker J., Richards V.P. et al. Draft genome sequence of an atypical strain of *Streptococcus pneumoniae* isolated from a respiratory infection. *Genome Announc.* 2014; 2 (4): e00822–e00814. DOI: 10.1128/genomeA.00822-14.

34. Hiller N.L., Eutsey R.A., Powell E. et al. Differences in genotype and virulence among four multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates belonging to the PMEN 1 clone. *PLoS One*. 2011; 6 (12): e28850. DOI: 10.1371/journal.pone.0028850.

35. Brückner R., Nuhn M., Reichmann P. et al. Mosaic genes and mosaic chromosomes-genomic variation in *Streptococcus pneumoniae*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 294 (2–3): 157–168. DOI: 10.1016/j.ijmm.2004.06.019.
36. Croucher N.J., Harris S.R., Fraser C. et al. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science*. 2011; 331 (6016): 430–434. DOI: 10.1126/science.1198545.
37. Bergmann S., Hammerschmidt S. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology*. 2006; 152 (2): 295–303. DOI: 10.1099/mic.0.28610-0.
38. Perez-Dorado I., Galan-Bartual S., Hermoso J.A. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Mol. Oral Microbiol.* 2012; 27 (4): 221–245. DOI: 10.1111/j.2041-1014.2012.00655.x.
39. Wizemann T.M., Heinrichs J.H., Adamou J.E. et al. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* 2001; 69 (3): 1593–1598. DOI: 10.1128/IAI.69.3.1593-1598.2001.
40. Maione D., Margarit I., Rinaudo C.D. et al. Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. *Science*. 2005; 309 (5731): 148–150. DOI: 10.1126/science.1109869.
41. Копылов А.Т., Згода В.Г. Количественные методы в протеомике. *Биомед. хим.* 2007; 53 (6): 613–643. [Kopylov A.T., Zgoda V.G. Quantitative methods in proteomics. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2007; 53 (6): 613–643. (In Russ.)]
42. Bittaye M., Cash P. *Streptococcus pneumoniae* proteomics: determinants of pathogenesis and vaccine development. *Exp. Rev. Proteomics*. 2015; (12): 6. DOI: 10.1586/14789450.2015.1108844.
43. Cole J.N., Djordjevic S.P., Walker M.J. Isolation and solubilization of gram-positive bacterial cell wall-associated proteins. *Methods Mol. Biol.* 2008; 425: 295–311. DOI: 10.1007/978-1-60327-210-0\_24.
44. Morscizek C., Prokhorova T., Sigh J. et al. *Streptococcus pneumoniae*: proteomics of surface proteins for vaccine development. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008; 14 (1): 74–81. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01878.x.
45. Ling E., Feldman G., Portnoi M. et al. Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 138 (2): 290–298. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2004.02628.x.
46. Sabarth N., Lamer S., Zimny-Arndt U. et al. Identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (31): 27896–27902. DOI: 10.1074/jbc.M204473200.
47. Gatlin C.L., Pieper R., Huang S.T. et al. Proteomic profiling of cell envelope associated proteins from *Staphylococcus aureus*. *Proteomics*. 2006; 6 (5): 1530–1549. DOI: 10.1002/pmic.200500253.
48. Cole J.N., Ramirez R.D., Currie B.J. et al. Surface analyses and immune reactivities of major cell wall-associated proteins of Group A *Streptococcus*. *Infect. Immun.* 2005; 73 (5): 3137–3146. DOI: 10.1128/IAI.73.5.3137-3146.2005.
49. Rodriguez-Ortega M.J., Norais N., Bensi G. et al. Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nat. Biotechnol.* 2006; 24 (2): 191–197. DOI: 10.1038/nbt1179.
50. Olaya-Abril A., Jimenez-Munguia I., Gomez-Gascon L. et al. Identification of potential new protein vaccine candidates through pan-surfomic analysis of pneumococcal clinical isolates from adults. *PLoS ONE*. 2013; 8 (7): e70365. DOI: 10.1371/journal.pone.0070365.
51. Lee E.Y., Choi D.Y., Kim D.K. et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus* derived membrane vesicles. *J. Proteomics*. 2009; 9: 5425–5436. DOI: 10.1002/pmic.200900338.
52. Olaya-Abril A., Prados-Rosales R., McConnell M.J. et al. Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Proteomics*. 2014; 106: 46–60. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.04.023.
53. Moffitt K.L., Gierahn T.M., Lu Y.J. et al. T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Cell Host Microb.* 2011; 9 (2): 158–165. DOI: 10.1016/j.chom.2011.01.007.
54. Moffitt K.L., Malley R., Lu Y.J. Identification of protective pneumococcal T(H)17 antigens from the soluble fraction of a killed whole cell vaccine. *PLoS One*. 2012; 7 (8): e43445. DOI: 10.1371/journal.pone.0043445.
55. Ogunniyi A.D., Grabowicz M., Briles D.E. et al. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2007; 75 (1): 350–357. DOI: 10.1128/IAI.01103-06.
56. Nouwens A.S., Cordwell S.J., Larsen M.R. et al. Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Electrophoresis*. 2000; 21 (17): 3797–3809. DOI: 10.1002/1522-2683(200011)21:17<3797::AID-ELPS3797>3.0.CO;2-P.
57. Lee K.J., Bae S.M., Lee M.R. et al. Proteomic analysis of growth phase-dependent proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Proteomics*. 2006; 6 (4): 1274–1282. DOI: 10.1002/pmic.200500415.