

Биоинформатический анализ специфических антигенов *T. pallidum*

Р.Ф. Хайруллин, С.В. Ротанов, Н.В. Фриго, А.В. Белоусова

Bioinformatic analysis of *T. pallidum* specific antigens

R.F. KHAIRULLIN, S.V. ROTANOV, N.V. FRIGO, A.V. BELOUSOVA

об авторах:

Р.Ф. Хайруллин — к.х.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 С.В. Ротанов — д.м.н., доцент, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 Н.В. Фриго — д.м.н., заместитель директора по научно-образовательной работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 А.В. Белоусова — лаборант-исследователь отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

С помощью методов биоинформатики (серверов PSI-BLAST, PSORTb, Cello, BOMP, TMBETADISC-PSSM, TMHMM, LipoP, UiB Lipo, SignalP) проанализированы последовательности 15 белков *T. pallidum*, которые могут являться потенциальными антигенами для диагностики сифилитической инфекции. Установлено, что перспективными для дальнейшего изучения могут являться белки Tr0259, Tr0453, Tr0608, Tr0326, Tr0249, Tr0136 и Tr0684.

Ключевые слова: сифилис, иммунопротеом, антигены *T. pallidum*, биоинформатический анализ, иммуногенность белков.

Using bioinformatics methods (PSI-BLAST, PSORTb, Cello, BOMP, TMBETADISC-PSSM, TMHMM, LipoP, UiB Lipo, SignalP servers), the authors analyzed sequences of fifteen *T. pallidum* proteins, which may be potential antigens for the diagnostics of the syphilitic infection. They revealed that Tr0259, Tr0453, Tr0608, Tr0326, Tr0249, Tr0136 and Tr0684 proteins may be promising for further studies.

Key words: syphilis, immunoproteasome, *T. pallidum* antigens, bioinformation analysis, protein immunogenicity.

■ Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» на период 2012—2014 гг. Раздел 1. Выполнение фундаментальных научных исследований. Наименование государственной работы: «Изучение генетической вариабельности возбудителей инфекций, передаваемых половым путем, циркулирующих на территории Российской Федерации», наименование работы «Поиск новых диагностически значимых антигенов возбудителя сифилитической инфекции» (Государственный контракт № 114/БУ-2012-051 от 16.01.2012).

В настоящее время основным методом лабораторного исследования для выявления больных сифилисом является определение в крови обследуемых

специфических антител к антигенам возбудителя заболевания *Treponema pallidum* [1—5]. Антитела выявляются различными иммунохимическими (серологическими) методами (иммуноферментный, иммунохемилюминесцентный, иммунохроматографический анализы, линейный иммуноблоттинг, исследование с применением проточной флюорометрии, технология иммуночипов); при этом в качестве наиболее специфических антигенов в составе наборов реагентов используются рекомбинантные аналоги антигенов *T. pallidum*: TrN15 (Tr0171), TrN17 (Tr0435), TrN47 (Tr0574), TrN44,5 (TrpA, Tr0768) [6, 7].

Иммунологические тесты, основанные на использовании вышеперечисленных антигенов, применяются как для первичного выявления больных сифилисом при обследовании различных контингентов населения,

так и для оценки состояния гуморального иммунного ответа у больных с активными формами инфекции и у пациентов, получивших специфическую антибактериальную терапию и находящихся под клинико-серологическим наблюдением [2, 8]; при этом ограниченный набор антигенов *T. pallidum*, входящих в состав иммуносорбента, не позволяет во всех случаях своевременно выявлять сифилитическую инфекцию [9].

Диагностикумы, применяемые для выполнения иммунохимических методов исследования, как правило, обладают высокой клинической чувствительностью (97—99,7%), но не дают 100% клинической специфичности, что в существенной степени зависит от используемого производителями состава антигенов *T. pallidum*. Ряд исследователей указывает на частую регистрацию ложноположительных результатов в трепонемных исследованиях для выявления сифилиса у пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта за счет определения у них антител к антигенам TrN17 и TrN47 [10]. Указанное явление свидетельствует о недостаточной специфичности используемых для исследования антигенов ввиду их иммуногенной близости с антигенами микроорганизмов, вызывающих воспалительные изменения периодонта, в том числе и трепонем-комменсалов.

При разных клинических формах и стадиях заболевания показатели эффективности иммунологических исследований для диагностики сифилиса могут существенно различаться [11], что может быть связано с различиями в уровне экспрессии отдельных антигенов *T. pallidum* и их доступности для иммунной системы больного. Все это вызывает необходимость поиска новых специфических антигенов *T. pallidum*, которые обладали бы высокой иммуногенностью и позволяли с высокой достоверностью устанавливать диагноз сифилиса на разных, в том числе ранних, стадиях инфекции.

Наибольший интерес для поиска новых антигенов *T. pallidum* представляют белки цитоплазматической и наружной мембраны, так как именно они в первую очередь являются мишенями для иммунной системы организма хозяина [12]. На экспериментальных животных моделях было показано, что антитела к белкам наружной мембраны играют важную роль в элиминации возбудителя из макроорганизма [13]. В то же время известно, что наибольшей иммуногенностью обладают липопротеины, локализующиеся на цитоплазматической мембране со стороны периплазмы, ввиду содержания в их структуре высокоиммуногенных радикалов жирных кислот [14—16].

К настоящему времени известна структура генома *T. pallidum*, представленного 1090 генами, 1039 из которых кодируют белки [17]. Однако иммунологические и физико-химические свойства большинства белков, входящих в структуру *T. pallidum*, долгое время оставались недостаточно изученными в связи с невоз-

можностью длительного культивирования патогенных штаммов *T. pallidum* на искусственных средах.

Широкомасштабное изучение белкового состава различных организмов, в том числе и возбудителя сифилиса, стало возможным благодаря развитию методов протеомики. С использованием протеомных методов исследования было выявлено и охарактеризовано более сотни новых иммуногенных белков *T. pallidum*, что существенно расширило знания об антигенной структуре микроорганизма [14, 15, 18].

Целью настоящего исследования явилось определение специфических антигенов *T. pallidum* для разработки новых высокоинформативных методов диагностики сифилиса на основе анализа опубликованных результатов протеомных исследований *T. pallidum* и использования методов биоинформатики.

Материал и методы

Выявление новых антигенов *T. pallidum* проводилось на основе сравнительного анализа данных, полученных в ходе выполнения протеомных исследований по серологическому скринингу и определению иммунной активности компонентов рекомбинантных экспрессионных библиотек [14] и нативных белков *T. pallidum*, разделенных методом двумерного электрофореза [15].

Отобранные на основании данных литературы антигены *T. pallidum* были дополнительно исследованы и охарактеризованы с использованием методов биоинформатики, целью которых являлось изучение свойств отобранных для изучения белков, в частности, определение аминокислотной последовательности белков, выявление сайтов липидирования, определение клеточной локализации, а также установление специфичности белков для рода *Treponema*, что играет важную роль при выборе антигенов для диагностических методов исследования.

Аминокислотные последовательности белков возбудителя сифилиса, соответствующие открытым рамкам считывания ДНК бактериальной хромосомы *T. pallidum*, были получены из депозитария Национального центра биотехнологической информации (Бетесда, США), содержащего последовательности полных геномов более чем 1000 микроорганизмов [19].

Для определения сходства аминокислотной последовательности отобранных белков с белками других микроорганизмов проводили поиск гомологии их первичной структуры против невырожденной базы белковых последовательностей NCBInr методами blastp и PSI-BLAST [20] (с применением статистического критерия значимости E-value < 10⁻³ и матрицы замен аминокислотных остатков BLOSUM62).

Для выявления липопротеинов, закодированных в геноме *T. pallidum*, проводился анализ с помощью серверов UIB Lipo [21] и LipoP [22]. Принцип работы указанных программ основан на распознавании так

называемых липо-боксов — участков в последовательности полипептида, узнаваемых сигнальной пептидазой II типа.

Для установления клеточной локализации отобранных белков использовали серверы PSORTb 3.0.2 [23] и Cello [24], представляющие собой программы для предсказания локализации белков с использованием математических расчетов, основанных на байесовских сетях и методе опорных векторов соответственно. В данных серверах реализован конвейерный подход анализа последовательностей белков с поиском гомологии с другими бактериальными белками, обнаружением специфических аминокислотных мотивов, профиля гидрофобности, сайтов распознавания сигнальными пептидазами.

Важным элементом определения локализации белков является анализ наличия в их структуре трансмембранных альфа-спиральных областей, сигнальной последовательности (сигнального пептида) и бета-складчатых участков.

Выявление трансмембранных альфа-спиральных областей белков проводили с помощью программы TMHMM Server v. 2.0. В данной программе альфа-спиральная топология участков белка предсказывается путем расчетов, проводимых на основе скрытых моделей Маркова, исходя из вероятностей нахождения аминокислотных остатков в различных сегментах белка (в трансмембранных, в цитоплазматической части и т. д.) и длины известных трансмембранных областей белков [25].

Наличие сигнального пептида у предшественников белков устанавливали с помощью сервера SignalP 4.0 [26]; структура сигнального пептида и сайт его расщепления предсказываются на основании оценки аминокислотной последовательности белка с использованием нейронных сетей.

Выявление бета-складчатых участков проводили с помощью серверов BOMP [27] и TMBETADISC-PSSM [28].

Для идентификации специфичности белков для рода *Treponema* применяли поиск геномной информации о возбудителях инфекций, передаваемых половым путем, по базе данных Национальной лаборатории Лос-Аламоса (США), которая содержит информацию о белках *T. pallidum* с Tr0001 по Tr1041 [29].

Результаты и их обсуждение

Дизайн исследования включал несколько этапов.

На первом этапе работы по выявлению новых специфических антигенов *T. pallidum* были проанализированы результаты исследований иммунопротеома *T. pallidum*, проведенных с использованием двух протеомных платформ: при серологическом скрининге библиотеки рекомбинантных белков *T. pallidum*, осуществленном М. Brinkman и соавт. [14], и серологическом скрининге нативных белков, разделенных ме-

тодом двумерного электрофореза, представленном в работе М. McGill и соавт. [15].

Из большого количества иммуногенных полипептидов *T. pallidum* (рис. 1, а, б), изучавшихся в вышеуказанных работах, нами были отобраны белки, серологическая реактивность (иммуногенность) которых в отношении человеческой сыворотки была подтверждена обеими протеомными платформами (рис. 1, в).

Среди 9 выявленных иммуногенных белков выделено 3 белковых антигена *T. pallidum*, которые широко используются в составе иммуносорбентов в современных наборах реагентов для иммуноферментных исследований: Tr0435 (TrN17), Tr0574 (TrN47), Tr0768 (TrpA, TrN44,5), в связи с чем они были исключены из дальнейшего исследования. Оставшиеся 6 белков были подвергнуты дальнейшему анализу.

В список потенциальных антигенов *T. pallidum*, отобранных для дальнейшего исследования, дополнительно были включены 9 белков, в том числе 7 белков, для которых описана экспрессия в клетках *T. pallidum* и выявлена иммуногенность в отношении сыворотки крови больных сифилисом на различных стадиях инфекционного процесса (Tr0108, Tr0249, Tr0259, Tr0453, Tr0608, Tr0886 и Tr0965 (см. рис. 1, б), а также еще 2 белка: Tr0136 и Tr0326 (см. рис. 1, а). Выбор белка Tr0326 был обусловлен тем, что это единственный белок *T. pallidum*, гомологичный известным белкам наружной мембраны других грамотрицательных микроорганизмов; для белка Tr0136 описана способность к связыванию человеческим фибронектином, что свидетельствует о возможности его участия во взаимодействии микроорганизма с внеклеточным матриксом человека и важной роли в патогенезе сифилиса.

Таким образом, на основе изучения результатов серологического скрининга для дальнейшего исследования нами было отобрано 15 белков *T. pallidum* (табл. 1).

На следующем этапе работы было проведено изучение свойств отобранных белков *T. pallidum* путем биоинформатического анализа их аминокислотных последовательностей.

Для выявления новых диагностически значимых антигенов *T. pallidum* учитывались следующие характеристики белков:

- наличие в составе белка липидных остатков (сайтов липидирования);
- расположение белка в клетке;
- специфичность для рода *Treponema*.

Для повышения точности предсказания свойств антигенов применяли комбинированное исследование последовательности белков с использованием нескольких программ.

Анализ сайтов липидирования. Важной характеристикой бактериальных антигенов является наличие в составе их молекулы остатков жирных кислот. Пока-

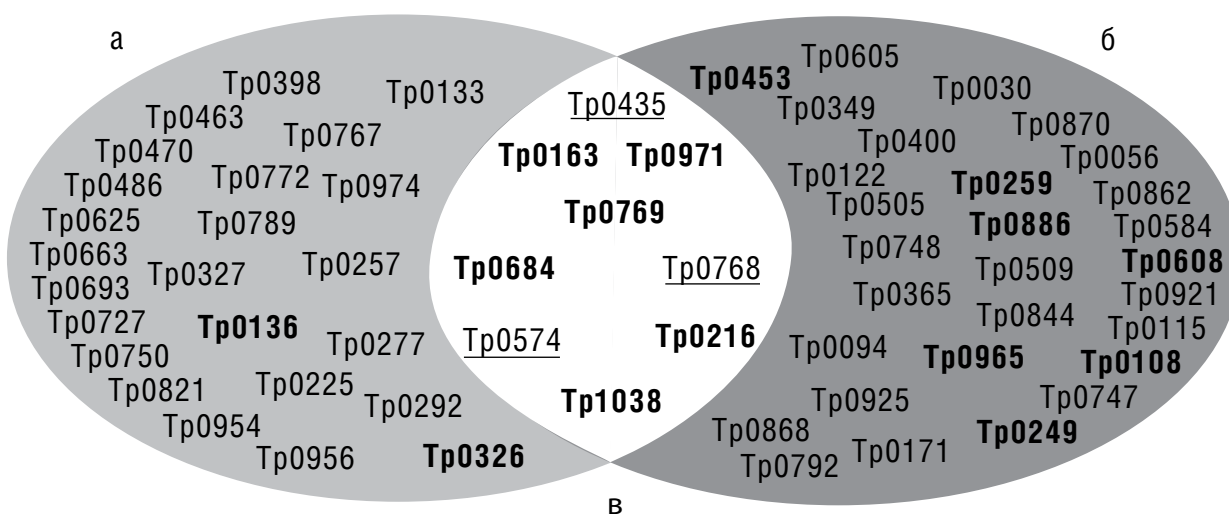


Рис. 1. Белки *T. pallidum*, иммунореактивные в отношении сыворотки крови больных сифилисом: *а* — по данным серологического скрининга рекомбинантных экспрессионных библиотек *T. pallidum* (Brinkman M. и соавт.); *б* — по данным серологического скрининга нативных белков *T. pallidum* (McGill M. и соавт.); *в* — белки, проявившие иммуногенные свойства в обоих протеомных методах (полужирным шрифтом отмечены белки, отобранные для дальнейшего изучения; подчеркнуты белки, широко применяемые в современных коммерческих наборах реагентов для диагностики сифилиса)

ТАБЛИЦА 1
Список белков *T. pallidum*, отобранных для биоинформатического анализа

| № п/п | № OPC | № по базе данных GenBank | Предполагаемая функция или локализация белка |
|-------|----------|--------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1 | TP0163* | 3322289 | ABC переносчик (TroA) |
| 2 | TP0216* | NP_218656.1*** | Молекулярный шаперон DnaK |
| 3 | TP0684* | 3322834 | Глюкозо/галактозосвязывающий белок (MglB-2) |
| 4 | TP0769* | 3322751 | Белок внешней мембраны (TprB) |
| 5 | TP0971* | NP_219408.1 | Лактоферрин-связывающий белок (Tr34, TrD) |
| 6 | TP1038* | NP_219475.1*** | Олигомерная форма бактериоферритина (TrF1, антиген c1-5, 4D) |
| 7 | Tr0108** | 3322371 | 6-фосфофруктокиназа |
| 8 | Tr0136** | 3322413 | Гипотетический белок |
| 9 | Tr0249** | NP_218689.1 | Белок флагеллярных филаментов (FlaA1) |
| 10 | Tr0259** | 3322536 | Мембранный липопроtein TrE |
| 11 | Tr0326** | 3322602 | Белок внешней мембраны |
| 12 | Tr0453** | NP_218894.1 | Гипотетический белок TP0453 |
| 13 | Tr0608** | 3322905 | Гипотетический белок TP0608 |
| 14 | Tr0886** | 3323203 | Полинуклеотидфосфорилаза (Pnp) |
| 15 | Tr0965** | 3323286 | Предполагаемый мембранный белок |

Примечания. * Белки, для которых показана иммунореактивность в обоих использованных протеомных методах [14, 15].

** Белки, которые выявлялись лишь в одном из методов протеомных исследований, но для которых показана иммуногенность в других работах.

*** OPC — открытая рамка считывания (номер в базе данных NCBI Reference Sequence).

зано, что липидные остатки в составе липопротеинов служат своеобразными адъювантами, значительно усиливающими иммунный ответ организма хозяина [16]. Для предсказания сайтов липидирования изучавшихся белков нами были использованы программы LipoP и UiB Lipo.

Выявление сайтов липидирования (липо-боксов) 15 отобранных белков в программе LipoP показало, что характерными участками модификации жирнокислотных радикалов обладали 6 белков *T. pallidum* (табл. 2), однако сервер UiB Lipo смог определить наличие сайтов липидирования только в 4 из них. Для верификации полученных результатов была проведена визуальная проверка и ручная обработка последо-

вательности белков, определенных программой LipoP как липопротеины (рис. 2).

Проведенная обработка данных позволила установить, что N-концевые участки этих белков содержат аминокислотный мотив, характерный для липо-боксов спирохет (в соответствии с критерием D. Naake [16]).

Таким образом, в результате проведенного биоинформатического анализа было установлено, что последовательности 5 белков (Tr0136, Tr0163, Tr0453, Tr0684, Tr0971) обладают структурой, характерной для липопротеинов спирохет.

Анализ расположения белков в клетке. Определение клеточной локализации белков *T. pallidum*

ТАБЛИЦА 2

Результаты биоинформатического анализа белков *T. pallidum*

| Номер открытой рамки считывания | Клеточная локализация | | Локализация на наружной мембране (наличие бета-складчатых участков) | | | Количество альфа-спиральных трансмембранных участков | Наличие сигнальной последовательности | Наличие сайта липидирования | | Клеточная локализация (на основании комплексного анализа) | Специфичность для рода <i>Treponema</i> |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------------|------|------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| | Программа | PSORTb 3.0 | Cello | BOMP | TMBETA-DISC-PSSM | | | TMHMM | SignalIP 3.0 | | |
| TR1038 | Цитопл. | Цитопл. | — | — | 0 | — | — | — | — | Цитопл. | — |
| TR0216 | Цитопл. | Цитопл. | — | — | 0 | — | — | — | — | Цитопл. | — |
| TR0684 | Перипл. | Цитопл. | — | — | 0 | + | — | + | + | Цитопл. мембр. | — |
| TR0769 | Неизв. | Цитопл./наружн. мембр. | — | — | 0 | + | — | — | — | Цитопл. мембр. | — |
| TR0971 | Цитопл. | Перипл./цитопл. | — | — | 0 | + | ++ | + | + | Цитопл. мембр. | — |
| TR0163 | Цитопл. мембр. | Цитопл. | — | — | 0 | + | ++ | + | + | Цитопл. мембр. | — |
| Tr0108 | Цитопл. | Цитопл. | — | — | 0 | — | — | — | — | Цитопл. | — |
| Tr0249 | Перипл. | Цитопл. | — | — | 0 | + | — | — | — | Цитопл. мембр. | — |
| Tr0259 | Цитопл. | Цитопл. | — | — | 0 | — | — | — | — | Цитопл. | + |
| Tr0608 | Цитопл. | Цитопл. | — | — | 1 | — | — | — | — | Цитопл. | + |
| Tr0886 | Цитопл. | Цитопл. | — | — | 0 | — | — | — | — | Цитопл. | — |
| Tr0453 | Неизв. | Наружн. мембр. | — | + | 1 | + | + | + | + | Наружн. мембр. | + |
| Tr0326 | Наружн. мембр. | Наружн. мембр. | + | + | 1 | + | — | — | — | Наружн. мембр. | — |
| Tr0136 | Секр. | Секр. | — | — | 1 | + | — | + | + | Цитопл. мембр. | — |
| Tr0965 | Цитопл. | Цитопл. | — | — | 1 | — | — | — | — | Цитопл. мембр. | — |

Примечание. Цитопл. — цитоплазматический; перипл. — периплазматический; неизв. — неизвестно; наружн. мембр. — наружная мембрана; секр. — секретрируемый; цитопл. мембр. — цитоплазматическая мембрана.

на основании анализа их аминокислотной последовательности сопряжено с трудностями, вызванными особым строением молекулярного комплекса, обеспечивающего транспорт белков через мембрану. Например известно, что для большинства микроорганизмов расположение бактериальных липопротеинов хорошо согласуется с природой аминокислотного остатка во втором положении после сайта отщепления сигнального пептида: в случае присутствия в этом участке аспарагиновой кислоты соответствующий белок локализуется на внутренней цитоплазматической мембране, если же на этом участке находится любая другая аминокислота, то соответствующий белок расположен на наружной мембране [30]. Однако для *T. pallidum* присутствие аспарагиновой кислоты в зрелом белке после N-концевого метионина не коррелирует с расположением белка на цитоплазматической мембране [31]. Поэтому при определении клеточной локализации белков *T. pallidum* помимо специализированных

серверов нами было проведено дополнительное исследование других структурных свойств белков — наличия сигнальных последовательностей, сайтов липидирования и трансмембранных альфа-спиральных областей.

При предсказании локализации антигена в клетке с помощью программ PSORTb и CELLO цитоплазматическая локализация была установлена обеими программами для 7 белков: Tr0108, Tr0216, Tr0259, Tr0608, Tr0886, Tr0965 Tr1038. Белок Tr0326 был определен как белок наружной мембраны, а белок Tr0136 определен обеими программами как секретруемый.

Для белков Tr0453, Tr0684, Tr0769, Tr0971, Tr0163, Tr0249 субклеточные локализации, предсказанные программами PSORTb и CELLO, не совпадали или идентифицировались только одной из программ. Поэтому для повышения точности анализа первичная структура отобранных белков была дополнительно изу-

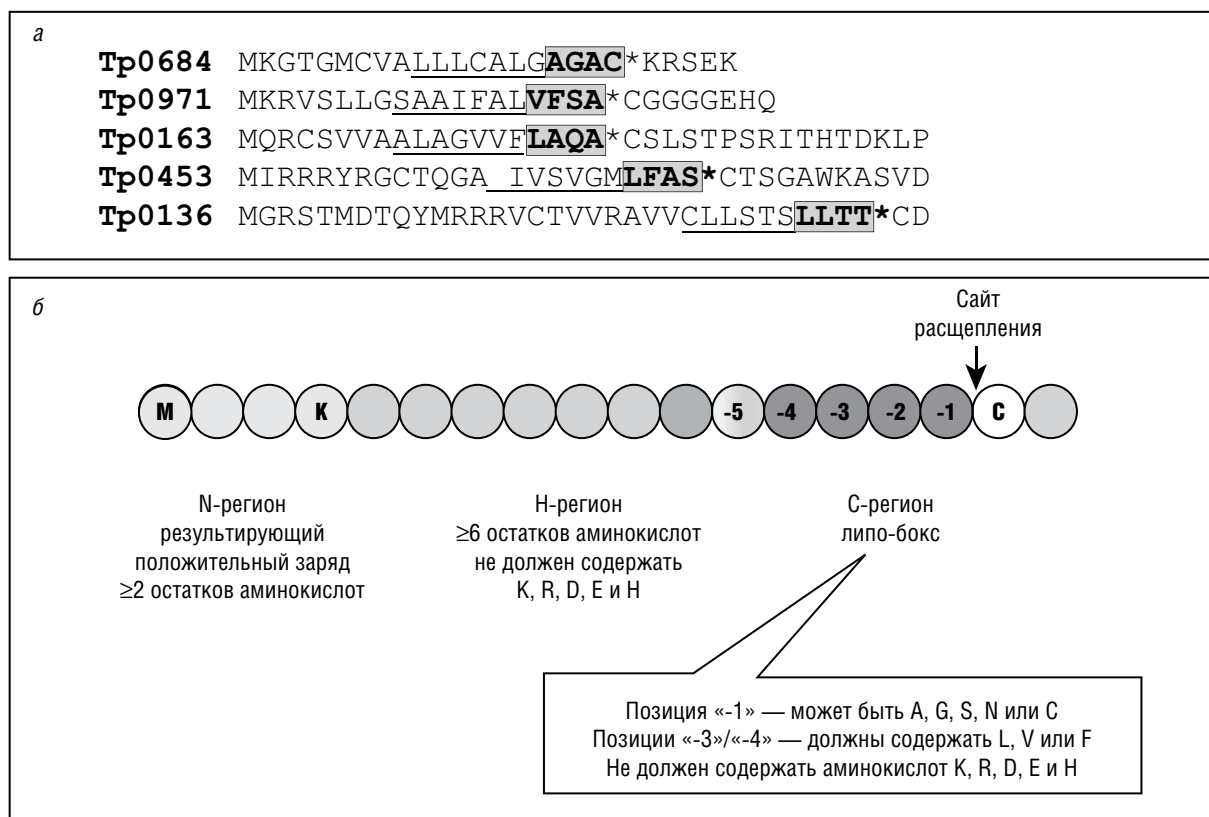


Рис. 2. Сравнение N-концевых последовательностей белков *T. pallidum* с консенсусной структурой липо-бокса спирохет: **а** — N-концевые последовательности белков *T. pallidum*, определенные программой LipOP как липопротеины; **б** — схема организации липо-бокса липопротеинов спирохет, согласно D. Нааке [16] (полужирным шрифтом выделены аминокислотные остатки липо-бокса; звездочкой отмечен сайт расщепления сигнального пептида)

чена путем определения сигнальных последовательностей, альфа-спиральных участков и бета-складчатых структур. Также при установлении расположения белка в клетке применялся поиск гомологичных белков других микроорганизмов с известной локализацией.

Известно, что присутствие сигнального пептида является характерной особенностью предшественников мембранных белков; при этом сигнальные пептиды специфических классов секреторируемых белков распознаются различными сигнальными пептидазами. Сигнальная последовательность липопротеинов обязательно содержит цистеин, к которому присоединяются жирные кислоты [31]. При проведении исследований с использованием сервера SignalP 4.0 присутствие сигнального пептида было установлено для 8 из 15 изучавшихся белков *T. pallidum* (Tr0136, Tr0163, Tr0249, Tr0326, Tr0453, Tr0684, Tr0769 и Tr0971), что указывало на вероятный экспорт этих белков через цитоплазматическую мембрану.

Согласно данным литературы, вероятность локализации белков со значительным количеством предсказанных альфа-спиральных участков на наружной мембране невелика [32], поэтому определение в последовательности белка предсказанных множественных альфа-спиральных участков исключает его локализацию на наружной мембране и позволяет рассматривать его как белок цитоплазматической мембраны. Проведенное с использованием программы ТННММ исследование показало наличие единичных трансмембранных альфа-спиральных участков для 5 из 15 белков *T. pallidum* (Tr0136, Tr0326, Tr0453, Tr0608, Tr0965). Таким образом, для этих белков не исключалась вероятность локализации на наружной мембране микроорганизма, так как отсутствие в структуре белка нескольких альфа-спиральных участков указывает на возможность их транспорта через цитоплазматическую мембрану [33].

При осуществлении биоинформатического анализа последовательностей белков, для которых были показаны иммуногенные свойства и выявлена локализация на наружной мембране, мы определяли наличие бета-складчатых структур с помощью серверов BOMP, TMBETADISC, так как считается, что бета-складчатые структуры являются универсальной характеристикой топологии бактериальных белков на наружной мембране [13].

Из 15 антигенов возбудителя сифилитической инфекции, отобранных для биоинформатического анализа, присутствие бета-складчатых структур было показано только для двух белков — Tr0326 и Tr0453; кроме того, для них же было установлено отсутствие множественных трансмембранных альфа-спиральных областей. Это позволило выдвинуть рабочую гипотезу о локализации белков Tr0326 и Tr0453 именно на наружной (а не на цитоплазматической) мембране *T. pallidum*. Дополнительное изучение данных науч-

ной литературы позволило выявить экспериментальные доказательства расположения белков Tr0326 и Tr0453 на наружной мембране [13], что подтвердило эффективность использованных нами биоинформатических подходов.

Белок Tr0965 был определен программами PSORTb и CELLO как цитоплазматический, для белка Tr0249 анализ структуры программой CELLO выявил цитоплазматическую локализацию, программой PSORTb — периплазматическую. Однако комплексный анализ последовательности этих белков выявил структурные особенности, которые не позволяют отнести их к цитоплазматическим белкам. Для белка Tr0249 установлено наличие сигнальной последовательности, что позволяет рассматривать данный белок в качестве предшественника мембранных белков. Кроме того, аминокислотная последовательность белка Tr0249 проявляет большое сходство (свыше 70%) с белком филаментов FlaA родственных спирохет, для которых характерно периплазматическое расположение. Так как результаты анализа последовательности этих белков не выявили наличия бета-складчатых структур, эти белки не могут рассматриваться как белки наружной мембраны.

Результаты поиска схожих белковых последовательностей белков по базам данных при помощи программы PSI-BLAST показали, что последовательность белка Tr0965 обладает высоким уровнем сходства с последовательностью связанных с цитоплазматической мембраной периплазматических субъединиц бактериальных транспортеров семейства RND грамотрицательных микроорганизмов.

Обнаруженное нами несоответствие результатов биоинформатического анализа клеточной локализации белков Tr0249 и Tr0965 может объясняться тем, что биоинформатические программы PSORTb и CELLO, разработанные для предсказания клеточной локализации белков, создавались на основе знаний о структуре белков наиболее изученного грамотрицательного микроорганизма — *E. coli* и не учитывали особенностей системы трансмембранного переноса белков *T. pallidum*. Таким образом, комплексный анализ последовательностей белков Tr0249 и Tr0965 позволил определить их локализацию на цитоплазматической мембране, в периплазматическом пространстве клетки *T. pallidum*.

Анализ наличия сигнальной последовательности и гомологии изучавшихся белков *T. pallidum* с известными мембранными белками показал, что характерными структурными особенностями белков цитоплазматической мембраны обладали 7 белков: Tr0136, Tr0163, Tr0249, Tr0769, Tr0684, Tr0965 и Tr0971. Для 4 из предсказанных белков цитоплазматической мембраны (Tr0136, Tr0163, Tr0684, Tr0971) также были обнаружены сайты липидирования, что позволяет предположить липопротеиновую природу этих антигенов.

Для белков, которые были определены как цитоплазматические (Tr0108, Tr0216, Tr0259, Tr0608, Tr0886 и Tr0965 Tr1038), сигнальные последовательности выявлены не были, что (вместе с отсутствием сайтов липидирования) служит подтверждением их цитоплазматической локализации.

Таким образом, в результате комплексного анализа последовательностей 15 отобранных для изучения белков *T. pallidum* 2 белка (Tr0326 и Tr0453) были определены как белки наружной мембраны, для 7 белков (Tr0136, Tr0163, Tr0249, Tr0769, Tr0684, Tr0965 и Tr0971) была предсказана локализация на цитоплазматической мембране, для 6 белков (Tr0108, Tr0216, Tr0259, Tr0608, Tr0886 и Tr1038) была установлена цитоплазматическая локализация.

Анализ специфичности выявленных белков *T. pallidum* для рода порядка *Spirochaetales* и рода *Treponema*. Анализ специфичности выявленных белков *T. pallidum* для порядка *Spirochaetales* и рода *Treponema* проводился с использованием базы данных Национальной лаборатории Лос-Аламоса (США) на основании анализа первичной структуры. Из всех 15 белков специфическими для порядка *Spirochaetales* оказались белки Tr0259, Tr0453, Tr0608, для ро-

да *Treponema* специфическими были только белки Tr0453 и Tr0608.

Заключение

Применение современных методов биоинформатики позволило отобрать потенциальные диагностически значимые белковые антигены *T. pallidum*, которые в перспективе могут быть использованы при разработке новых тест-систем для диагностики сифилиса. Учитывая такие показатели, как специфичность белков для порядка *Spirochaetales* и рода *Treponema*, кандидатами для изучения могут являться белки Tr0259, Tr0453, Tr0608. Однако при оценке специфичности антигенов в иммунологических исследованиях следует учитывать не только их первичную структуру, но и пространственное расположение антигенных эпитопов, что возможно проверить при экспериментальном изучении этих белков. Поэтому для дальнейшего экспериментального изучения белковых антигенов *T. pallidum* с учетом их предсказанной клеточной локализации и наличия сайтов липидирования представляют интерес также белок наружной мембраны Tr0326, белок цитоплазматической мембраны Tr0249, липопротеины Tr0136 и Tr0684. ■

Литература

- Черешнев В.А., Патрушева Н.Б., Бейкин Я.Б. и др. Сифилис: Иммунитет и лабораторная диагностика. Екатеринбург: УрО РАН; 2006.
- Соколовский Е., Фриго Н., Ротанов С. Руководство по лабораторной диагностике сифилиса в странах Восточной Европы. Вестн. дерматол. и венерол., 2008; (5): 87—96.
- Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем. М.: Медицина, 1987.
- Китаева Н.В., Фриго Н.В., Мелехина Л.Е. Актуальные проблемы сифилидологии. Современные технологии диагностики сифилитической инфекции. Вестн. дерматол. и венерол., 2008; 5: 51—59.
- Китаева Н., Фриго Н., Ротанов С. и др. Перспективы диагностического использования протеомных технологий в диагностике ИППП и заболеваний кожи. Вестн. дерматол. и венерол., 2010; 4: 17—27.
- Sambri V., Marangoni A., Simone M. et al. Evaluation of recomWell Treponema, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis. Clin microbiol and infect; 2001; 7 (4); 200—205.
- Sato N., Suzuki T., Ueda T. et al. Recombinant antigen-based immuno-slot blot method for serodiagnosis of syphilis. Braz Jf medi biol res; 2004; 37: (7): 949—955.
- Приказ Минздрава РФ № 87 от 26.03.2001 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса».
- Young H. SYPHILIS: Serology. Dermatol clini; 1998; 16 (4); 691—698.
- Riviere G.R., Wagoner M.A., Baker-Zander S.A. et al. Identification of spirochetes related to Treponema pallidum in necrotizing ulcerative gingivitis and chronic periodontitis. N Engl J Med 1991; 325 (8); 539—543.
- Carlson J.A., Dabiri G., Cribier B. et al. The immunopathobiology of syphilis: the manifestations and course of syphilis are determined by the level of delayed-type hypersensitivity. Amer Jf dermatopathol; 2011; 33 (5): 433—460.
- Tomson F.L., Conley P.G., Norgard M.V. et al. Assessment of cell-surface exposure and vaccinogenic potentials of Treponema pallidum candidate outer membrane proteins. Microbes and infection; 2007; 9 (11); 1267—1275.
- Cox D.L., Luthra A., Dunham-Ems S. et al. Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of Treponema pallidum. Infect and Immuni; 2010; 78 (12): 5178—5194.
- Brinkman M.B., Mckevitt M., Mcloughlin M. et al. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the Treponema pallidum proteome. J clini microbiol; 2006; 44 (3); 888—891.
- Mcgill M.A., Edmondson D.G., Carroll J.A. et al. Characterization and Serologic Analysis of the Treponema pallidum Proteome. Infect and Immuni; 2010; 78 (6); 2631—2643.
- Haake D.A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiol; 2000; 146 (7); 1491—1504.
- Norris S.J., Cox D.L., Weinstock G.M. Biology of Treponema pallidum: correlation of functional activities with genome sequence data. J Mol Microbiol Biotechnol 2001; 3 (1); 37—62.
- Mckevitt M., Brinkman M.B., Mcloughlin M. et al. Genome scale identification of Treponema pallidum antigens. Infect and Immuni 2005; 73 (7); 4445—4450.
- Entrez: the Life Sciences Search Engine [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 1991; Доступно по адресу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>
- Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search tool. J f Molec Biol 1990; 215 (3); 403—410.

21. Berven F.S., Karlsen O.A., Straume A.H. et al. Analysing the outer membrane subproteome of *Methylococcus capsulatus* (Bath) using proteomics and novel biocomputing tools. *Arch Microbiol* 2006; 184 (6): 362—377.
22. Juncker A.S., Willenbrock H., Von Heijne G. et al. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram — negative bacteria. *Protein Science* 2009;12 (8): 1652—1662.
23. Yu N.Y., Wagner J.R., Laird M.R. et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization sub-categories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 2010; 26 (13): 1608—1615.
24. Yu C.S., Chen Y.C., Lu C.H. et al. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 2006; 64 (3) 643—651.
25. Moller S., Croning M.D., Apweiler R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 2001; 17 (7): 646—653.
26. Petersen T.N., Brunak S., Von Heijne G. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011 Sep 29; 8 (10):785-6. doi: 10.1038/nmeth.1701.;
27. Berven F.S., Flikka K., Jensen H.B. et al. BOMP: a program to predict integral β -barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria. *Nucleic acids research* 2004;32 (suppl 2); W394-W399.
28. Ou Y.Y., Gromiha M.M., Chen S.A. et al. TM-BETADISC-RBF: Discrimination of-barrel membrane proteins using RBF networks and PSSM profiles. *Computational biology and chemistry*; 2008; 32 (3); 227.
29. STD Sequence Databases — 2003; Доступно по адресу: <http://www.stdgen.lanl.gov>
30. Yamaguchi K., Yu F., Inouye M. A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* 1988; 53 (3): 423—432.
31. Setubal J.C., Reis M., Matsunaga J. et al. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. *Microbiol* 2006; 152 (1): 113—121.
32. Cullen P.A., Haake D.A., Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Revi*; 2004; 28 (3): 291—318.
33. Rey S., Acab M., Gardy J.L. et al. PSORTdb: a protein subcellular localization database for bacteria. *Nuclc acids Rese* 2005; 33 (suppl 1); D164-D168.