

ЗАХАРЖЕВСКАЯ НАТАЛЬЯ БОРИСОВНА

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВНЕШНЕМЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ
ТОКСИГЕННОГО И НЕТОКСИГЕННОГО ШТАММОВ
BACTEROIDES FRAGILIS**

03.01.04 – Биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Федеральном научно-клиническом центре физико-химической медицины» Федерального
медико-биологического агентства России

Научный д.б.н. профессор, академик РАН,
руководитель: **Говорун Вадим Маркович**

Официальные **Летаров Андрей Викторович**
оппоненты: доктор биологических наук,
Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук», заведующий лабораторией

Катруха Алексей Генрихович
доктор биологических наук, профессор,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, кафедра биохимии, руководитель группы –
ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской
академии наук

Защита состоится 25 января 2018 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета
Д 001.010.01 при и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по
адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИБМХ www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук



Карпова Е.А

.

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Микрофлора желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) характеризуется значительным разнообразием микроорганизмов, большинство из которых являются анаэробами. При этом род *Bacteroides* составляет около 25% всех анаэробных бактерий, населяющих ЖКТ. *Bacteroides fragilis* – уникальный вид рода *Bacteroides* представлен в составе микрофлоры непатогенными штаммами (NTBF), способствующими ферментации углеводов, а также моделирует иммунный ответ при воспалительных заболеваниях толстой кишки, и токсигенными штаммами *B. fragilis* (ETBF), напротив, определяющими развитие воспалительной патологии ЖКТ, включая рак толстой кишки. В ходе исследований ETBF штаммов был выявлен специфический токсин, названный фрагилизин (BFT – *Bacteroides fragilis* toxin), действие которого направлено на протеолитическую деградацию белка межклеточных контактов - E-кадгерина. Однако механизмы секреции и доставки токсина до клеток-мишеней на сегодняшний день не определены. При этом внешнемембранные везикулы являются универсальным способом секреции у грамотрицательных бактерий, к которым относится и *B. fragilis*. Для целого ряда токсинов других патогенных бактерий, везикулы уже определены, как механизм транспорта и доставки токсинов.

Согласно полученным в ходе данной работы данным, уникальная третичная структура BFT с множеством гидрофобных зон, опосредует возможность взаимодействия токсина со структурами везикулы. Полный сравнительный биохимический профиль везикул ETBF и NTBF позволил предположить варианты осуществления межклеточной коммуникации, обуславливающие различные типы взаимоотношений, включая симбиоз, комменсализм и паразитизм, а также способствовал выявлению новых факторов вирулентности. Работа позволила сформировать новые положения об особенностях адаптации патогенных микроорганизмов посредством везикул, в ходе инфекции и последующей персистенции в организме хозяина.

Цель исследования

Провести сравнительный системный анализ везикул патогенного и непатогенного штаммов *B. fragilis*, а также определить роль везикул в процессе секреции и доставки токсина – фрагилизина.

Задачи исследования:

1. Разработать метод получения и оценки препарата везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов *B.fragilis*
2. Провести поиск токсина в препарате везикул, определить способ его секреции и доставки до клеток мишеней
3. Исследовать ферментативную активность токсин-содержащих везикул в отношении известного субстрата – белка межклеточных контактов – E-кадгерина.
4. Провести комплексное протеометаболомное профилирование везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов *B.fragilis*. Реконструировать карты метаболической активности везикул обоих штаммов.

Научная новизна и практическая значимость

Настоящая работа направлена на изучение принципов межклеточной коммуникации, осуществляемой непатогенными и патогенными видами *B. fragilis* посредством везикул, а также способствует пониманию механизма секреции и доставки токсина посредством везикул. *B. fragilis* является естественным симбионтом и представителем нормальной микрофлоры ЖКТ. Однако, патогенные бактерии способствуют развитию тяжелых воспалительных заболеваний, приводящих к дисфункции клеток ЖКТ. Учитывая факт отсутствия фактических знаний о принципах взаимодействия *B. fragilis* с клетками эпителия кишки, а также механизмах секреции и доставки токсина, данная работа представляет не только фундаментальный, но и практический интерес.

Основываясь на результатах полученных методами протеомного и метаболомного профилирования, представляется возможным оценить функциональную активность везикул. Впервые, в данной работе проведена комплексная, сравнительная, протеоеномная и метаболомная аннотация, входящих в состав везикул обоих штаммов *B.fragilis* белков и метаболитов. Методом метаболомного анализа с применением изотопно-меченой глюкозы, подтверждена активность реконструированных на основе комплексного протеометаболомного профилирования биохимических реакций. Методами электронной микроскопии с применением антител к токсину, меченых золотом, а также иммуноблота, впервые получены данные об ассоциации токсина с мембраной везикулы. Посредством компьютерного моделирования, с последующим подтверждением полученных данных методами ЯМР и флюоресцентного тушения, получена достоверная оценка показанного ранее взаимодействия, и предложен механизм секреции и доставки

токсина до клеток – мишеней. Фундаментальным приложением полученных данных является формирование основы для последующего системного изучения везикул клинически значимых бактерий, а также представителей микрофлоры человека. Кроме того, обилие обнаруженных в везикулах ЕВТФ ферментов и потенциальных факторов вирулентности, будет исследовано для проверки ряда гипотез о механизмах межклеточных коммуникаций и адаптации бактерий в организме хозяина. Явление взаимодействия токсина с мембраной везикулы, подтвержденное физико-химическими методами анализа, является основой для формирования нового типа антимикробных препаратов. Основное действие созданных препаратов, будет направлено на механизмы формирования везикул у патогенных штаммов *B. fragilis*, а также на изменение физико-химических свойств токсина, опосредующих его взаимодействие, последующую секрецию и доставку к клеткам-мишеням.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. ЕТВФ и НТВФ производят различные по протеомному составу везикулы, при этом формирование везикул у ЕТВФ штамма идет с преимущественным захватом значительного количества цитоплазматических белков, среди которых преобладают ферменты важнейших метаболических реакций.
2. Метаболическая характеристика везикул, дополненная результатами метаболомного анализа с применением изотопно-меченой глюкозы, позволила определить наличие последовательных биохимических реакций, протекающих преимущественно в везикулах ЕВТФ, что, вероятно, опосредовано необходимостью длительной персистенции и адаптации патогена в организме хозяина
3. Согласно данным электронной микроскопии и иммуноблота, токсин, а также фермент – цистеиновая протеаза, участвующая в его созревании, входят в состав везикулы ЕТВФ, что, свидетельствует о локализации процессинга в периплазме или в формирующихся везикулах
4. Физико-химические методы анализа продемонстрировали ассоциацию токсина с липидами, гидрофобное взаимодействие с которыми способствует фиксации токсина в мембране везикулы и последующей его доставке к клеткам-мишеням
5. Согласно данным флуоресцентной микроскопии культуры клеток НТ-29/С1, подвергнутой влиянию везикул ЕТВФ и НТВФ, токсин в составе везикул ЕВТФ приводит к агрегации везикул и увеличивает адгезию к клеткам линии НТ-29/С1, что способствует увеличению локальной концентрации токсина на поверхности клеток-мишеней

6. Везикулы ЕТBF содержат активную форму токсина, которая действует опосредованно на известный субстрат - Е-кадгерин – белок клеточного контакта, приводя к его деградации.

Личный вклад автора

Научные результаты, изложенные в диссертации, являются работой непосредственно автора и группы исследователей под руководством автора. Последующий анализ полученных инструментальных данных, обобщение литературных данных и оценка результатов работы выполнена лично автором под руководством Говоруна В.М.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на конференции молодых ученых ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, 22-23 апреля 2014 г.; на итоговой научно-практической конференции ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА, Москва, 15-16 декабря 2015 г; на итоговой научно-практической конференции ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА, Москва, 20-21 декабря 2016 г; на 38-ом конгрессе Европейского биохимического сообщества (FEBS congress), Санкт-Петербург, 6-11 июля 2013 г.; на IV Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», Казань, 29 октября – 1 ноября 2014 г.; на V съезде Биохимиков России, Сочи-Дагомыс, 4-9 октября 2016 г.; на 7-ой международной конференции и выставке по Метаболизму, Орландо, Флорида, США, 14-16 ноября 2016 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ в российских и международных научных изданиях, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК и 8 публикаций в сборниках научных конференций.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация содержит следующие разделы: введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложение. Работа изложена на 161 странице, содержит 16 таблиц и 43 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Выделение и микроскопическое исследование препарата везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов *B.fragilis*.

В настоящей работе были использованы клинические изоляты *B. fragilis* BOB25 (далее в работе – ETBF (enterotoxigenic *B.fragilis*)), любезно предоставленный Тараскиной А.Е. (Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия) и 323-J-86 (далее в работе – NTBF (nontoxigenic *B.fragilis*)), любезно предоставленный Шкопоровым А.Н. (Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия). ETBF и NTBF штаммы были культивированы в анаэробных условиях до достижения логарифмической фазы роста. Выделение везикул проводилось из 250 мл ночной суспензионной культуры посредством ультрацентрифугирования и фильтрации. Изолированный препарат везикул, как и бактериальные культуры обоих штаммов были исследованы методами трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). На основании данных ТЭМ бактериальных срезов было отмечено формирование везикул токсигенного (ETBF) и нетоксигенного (NTBF) штаммов *B.fragilis* (Рисунок 1).

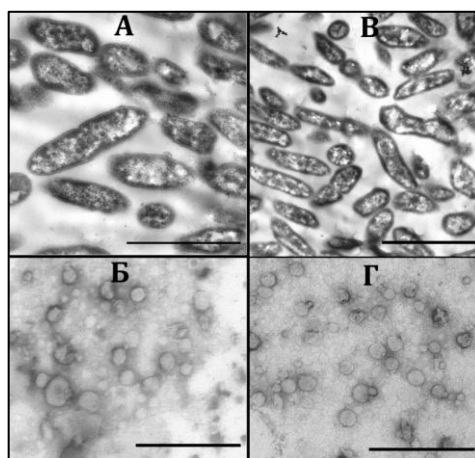


Рисунок 1 Электронная микроскопия препаратов бактериальных клеток и выделенных везикул ETBF и NTBF. А, В – ультратонкие срезы бактерий ETBF и NTBF; Б,Г – препараты везикул ETBF и NTBF в режиме негативного контрастирования. Масштабные отрезки для А и В - 1 мкм, для Б и Г - 500 нм. (ТЭМ выполнена Вишняковым И.И., сотрудником лаборатории структурной организации генома, ФГБУН Институт цитологии РАН)

Согласно визуальной оценке порядка 1000 везикул в различных препаратах ETBF и NTBF был определен диапазон размеров везикул *B.fragilis* обоих штаммов, который составил от 20 до 100 нм. До 50 процентов везикул, исследованных в препаратах, имели размеры от 30 до 50 нм, что согласуется с литературными данными.

Протеомное исследование везикул ETBF и NTBF

Выделенные и очищенные везикулы, а также бактериальные клетки обоих штаммов были проанализированы независимо друг от друга с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС. В ходе протеомного анализа для ETBF везикул, было определено 393 белка, а для NTBF везикул - 290 белков. Все выявленные белки были сортированы согласно клеточной локализации посредством программного обеспечения PSORTb 3 (Рисунок 2).

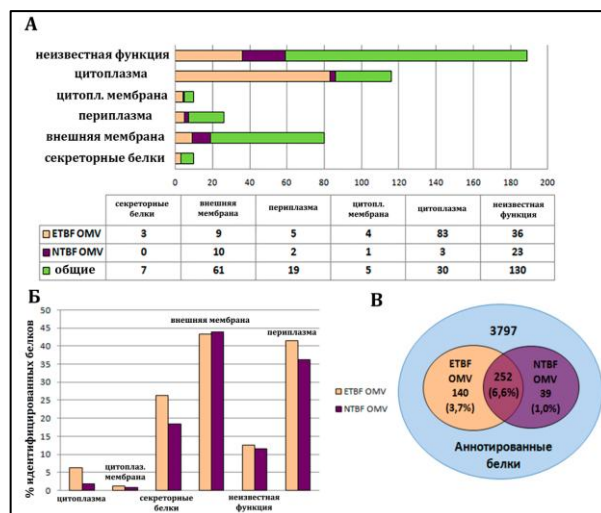


Рисунок 2 Распределение идентифицированных белков везикул ETBF и NTBF согласно их клеточной локализации. А – Предсказанная клеточная локализация белков, выделенных из везикул (OMV) ETBF и NTBF согласно данным базы PSORTb 3.0.(Improved protein subcellular localization). Б – Процентное соотношение белков, идентифицированных в везикулах, к общему количеству аннотированных для *B.fragilis* белков согласно их клеточной локализации. В- Диаграмма Венна отражает индивидуальные отличия в количестве и процентном соотношении белков, идентифицированных в везикулах (OMV) ETBF и NTBF по отношению к общему количеству аннотированных для *B.fragilis* белков. (Выполнено совместно с Алтуховым И.А., сотрудником Московского института физики и технологии и Бутенко И.О. сотрудником лаборатории протеомного анализа, ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

Среди обнаруженных белков наружной мембраны, была определена группа TonB белков, включающих TonB-зависимые рецепторы и TonB-связанные белки наружной мембраны. Белки периплазмы были представлены преимущественно ферментами класса гидролаз, ответственными за утилизацию полисахаридов на поверхности эпителиальных клеток. Схожие данные по наличию гидролаз в составе везикул, ранее полученные для NTBF, были подтверждены в настоящей работе и дополнены данными протеомного исследования везикул ETBF. Отличительной особенностью данной работы стало выявление значительного числа белков цитоплазмы в составе везикул ETBF. Количество выявленных цитоплазмальных белков составило 95 или приблизительно 30% от всех идентифицированных белков ETBF везикул, для которых была определена клеточная

локализация. В везикулах NTBF также были определены белки цитоплазмы, но с менее выраженным разнообразием.

Среди белков цитоплазмального происхождения были выявлены ферменты 5 классов: гидролазы, изомеразы, лиазы, оксидоредуктазы, трансферазы (**Рисунок 3 А**).

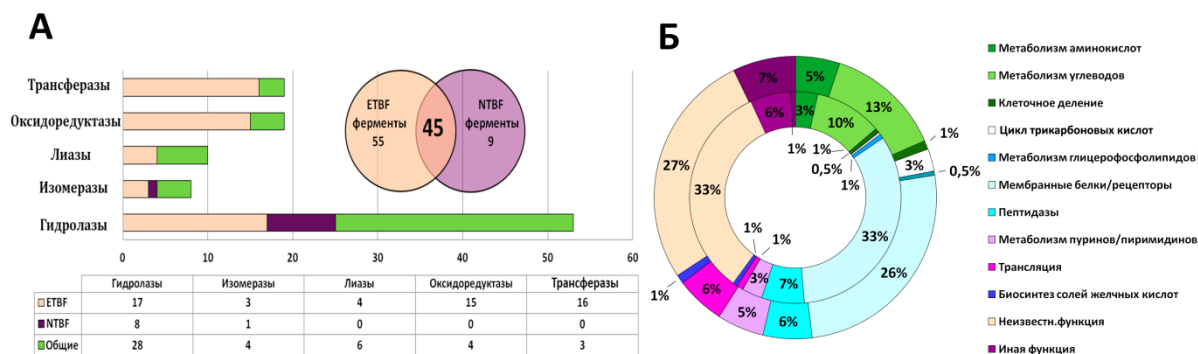


Рисунок 3 Ферменты, идентифицированные в везикулах ETBF и NTBF. **А** - Столбчатая гистограмма отражает распределение ферментов, идентифицированных в везикулах обоих штаммов *B.fragilis* согласно классификации по классам ферментов. Диаграмма Венна представляет сравнительный анализ индивидуальных различий и общее количество ферментов, идентифицированных в везикулах обоих штаммов *B.fragilis*. **Б** - Основные функциональные метаболические пути, определенные согласно идентифицированным в везикулах ETBF и NTBF белкам. Внешняя диаграмма определяет процентное соотношение белков, согласно указанным метаболическим и функциональным характеристикам для везикул ETBF. Внутренняя диаграмма определяет процентное соотношение белков, согласно указанным метаболическим и функциональным характеристикам для везикул NTBF.

Наборы ферментов у ETBF и NTBF были отличными. Так у токсигенного штамма выявлено порядка 55 уникальных ферментов, в отличие от NTBF, для которого было обнаружено всего 9. Количество ферментов классов изомераз и лиаз было приблизительно равно в двух типах везикул. Основным отличием стало обнаружение ферментов класса оксидоредуктаз, в числе которых глутатионпероксидазы, использующиеся для адаптации к окислительному стрессу.

Соотнося выявленные ферменты с различными метаболическими путями, было показано, что большинство ферментов ETBF и NTBF везикул связаны с углеводным обменом, путями деградации гликанов и аминокислот, а также обменом нуклеотидов (**Рисунок 3 Б**). Для NTBF везикул основное количество ферментов принадлежало к классу гидролаз, что обеспечивало в основном функцию ферментативного гидролиза полисахаридов. Ферменты, обнаруженные в везикулах ETBF, напротив, оказались вовлеченными в основные метаболические пути, такие как гликолиз, пентозофосфатный путь и цикл трикарбоновых кислот, способствующие формированию АТФ.

Одной из важнейших задач в ходе сравнительного анализа протеома везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов являлось обнаружение факторов вирулентности и патогенности. Согласно протеоеномной аннотации в составе островка патогенности (BfPAI), расположенного в пределах конъюгативного транспозона CTn86 определяются 65 белков, включая главный фактор вирулентности *B.fragilis* – токсин – фрагилизин. В ходе анализа протеома ETBF везикул, было обнаружено несколько белков, принадлежащих к островку патогенности: TonB-зависимый рецептор (VU15_RS14380), гипотетический белок (VU15_RS14430), который согласно анализу гомологии (Protein Blast) потенциально является белком наружной мембраны OmpA, а также холоилглицин гидролаза (VU15_RS14400), являющаяся участником процесса конъюгации желчных кислот.

Определение токсина методами иммуноблота и электронной микроскопии

Для обнаружения токсина BFT2 (*Bacteroides fragilis* toxin, изоформа 2) методом вестерн-блота с использованием поликлональных антител (анти-BFT2), специфичных по отношению к BFT2 был проанализирован препарат тотального белка, выделенного из ETBF и NTBF везикул. Незрелая (pBFT2) и процессированная изоформы (mBFT2) рекомбинантного токсина, а также поликлональные антитела против токсина (АТ-BFT2) были любезно предоставлены лабораторией генной инженерии ФГБУ “ФНКЦ ФХМ” ФМБА России. В ходе иммуноблот анализа, во фракции везикул был обнаружен токсин в процессированной форме (mBFT2), что подтвердило предположение об участии везикул в процессе секреции токсина (**Рисунок 4**)

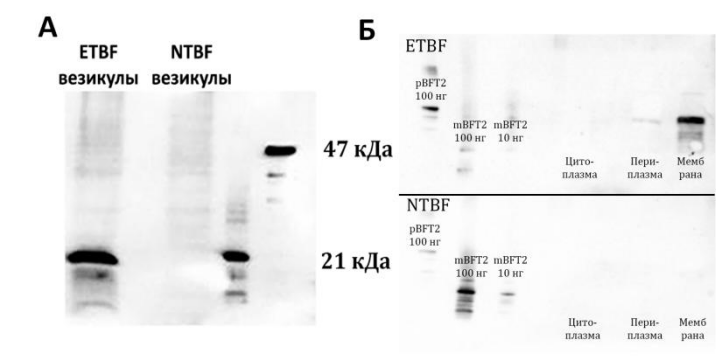


Рисунок 4 Иммуноблот препарата везикул и клеточных фракций ETBF и NTBF с использованием антител против BFT2. А - 5 мкг белка, выделенного из препаратов везикул ETBF (1) и NTBF(2) штаммов было взято для проведения ПААГ электрофореза с последующим иммуноблотом. В качестве контроля были использованы по 100 нг рекомбинантных форм белка – BFT2. Незрелая форма – 3 и процессированная форма – 4. Б - Для анализа было взято по 1 мкг следующих клеточных фракций ETBF и NTBF: цитоплазменная, периплазменная и мембранная. После проведения ПААГ электрофореза с последующим иммуноблотом был проведен анализ локализации токсина. Для контроля были использованы две рекомбинантные формы токсина (100 нг каждого и 10 нг mBFT2).

Так как основной фермент, участвующий в процессинге токсина – клострипейн (цистеиновая протеаза) был также обнаружен в везикулах, мы предположили, что созревание фрагилизина происходит в везикуле или в периплазме, где вероятность попадания обоих белков в состав протеома везикулы очень большой.

Для определения структуры бактериальной клетки в большей степени, накапливающей токсин, было проведено исследование мембранной, периплазматической и цитоплазматической клеточных фракций. В результате непротравленная форма токсина - pBFT2 была обнаружена в мембранной фракции и небольшое ее количество в периплазме клеток ETBF.

Однако использование методики ТЭМ с антителами, меченными золотом, позволило существенно расширить представления о локализации токсина и о вероятном пути транспорта, осуществляемого посредством везикул. Поликлональные антитела (анти-BFT2), конъюгированные с частицами золота размером 10 нм, были использованы для окрашивания срезов бактериальных клеток. В качестве контроля специфичности антител, как и в случае иммуноблота, были использованы препараты NTBF. В результате были получены электронные микрофотографии, где отчетливо определяется мембранная локализация токсина (**Рисунок 5 А-Г**)

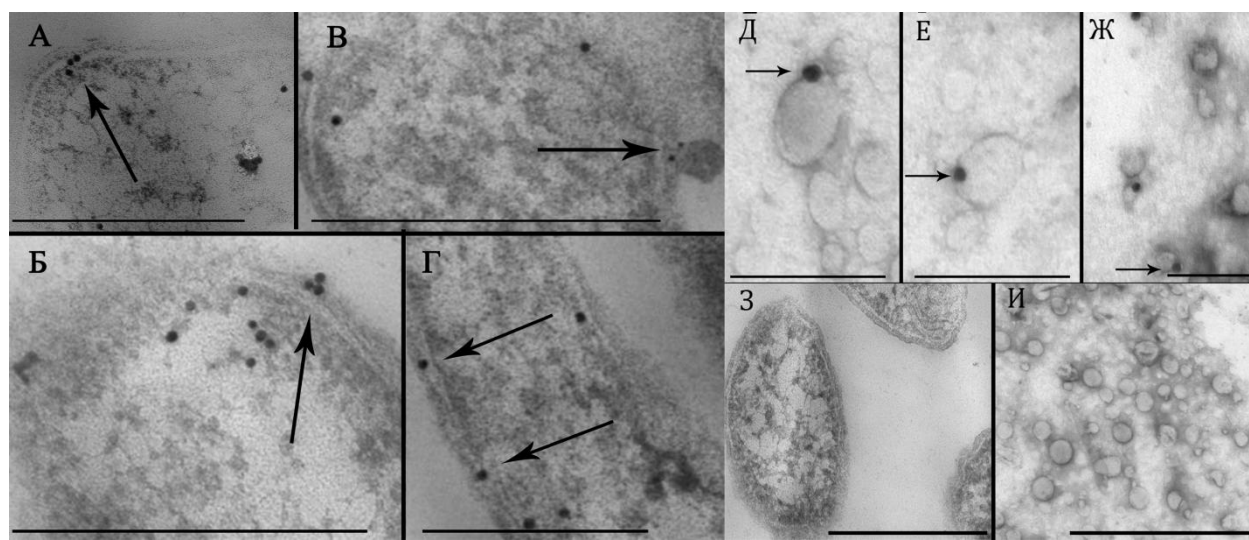


Рисунок 8 Идентификация BFT2 методом электронной микроскопии с применением антител конъюгированных золотом. А-Г ультратонкие срезы клеток ETBF с применением антител конъюгированных с частицами золота (черные точки). Стрелки указывают на преимущественное расположения антител с золотом в области клеточных мембран. В – стрелка указывает на фиксацию антител в зоне формирования везикулы на поверхности бактериальной клетки. Масштабные отрезки для А и Г – 300нм, для Б и В - 500 нм. Д-Ж - препараты везикул с фиксированными на поверхности антителами с частицами золота (черные стрелки), оцененные методом электронной микроскопии в режиме негативного контрастирования. З - ультратонкий срез культуры NTBF и И – везикулы NTBF использованы для контроля специфичности антител против BFT2. Масштабные отрезки для Д-Е – 100 нм, для Ж – 150 нм, для З – 600 нм, для И – 400 нм.

Данным способом были также исследованы препараты везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов. В результате метка коллоидного золота, конъюгированная с антителами против токсина, была обнаружена в мембране везикул (**Рисунок 5 Д-И**)

Полученные результаты и их анализ, позволил заключить, что взаимодействие специфических антител с токсином на поверхности клеток и везикул свидетельствует о наличии высокой степени тропности фрагмента к мембране клетки, и как следствие – к везикулярной мембране.

Липидомное исследование структур мембраны и компьютерное моделирование процессов мембранной ассоциации токсина

Для исследования компонентов мембраны *B.fragilis*, с которыми потенциально может взаимодействовать токсин, был применен способ анализа липидов методом прямого ввода образца. Для этой цели отдельно были выделены липиды мембраны бактерии и липополисахарид (ЛПС). При фрагментации мембранных липидов, в первую очередь были обнаружены характерные ионы полярных групп фосфолипидов, а также переменных остатков жирных кислот. Отдельно была проанализирована структура липополисахарида (ЛПС). В результате было определено 38 различных соединений, входящих в состав ЛПС, среди которых выявили липид А-дисахарид-1-фосфат, 3-дезоксид-манно-октулозонил-липид IV (А), KDN α 2-3Gal β 1-4Glc β -COP (D18: 1/24: 1 (15Z)) и многочисленные галактозилцерамиды и гликозилцерамиды (полисахаридные цепи, состоящие из 4-х до 8 углеводных единиц). Структура обнаруженного липида А-дисахарид-1-фосфата была такой же, как ранее описанного Elhenawy и соавт. Для моделирования процессов взаимодействия токсина со структурами мембраны были выбраны в качестве мишени две формы токсина (pBFT2 и mBFT2). В качестве лигандов, в соответствии с результатами липидомного исследования, выступали два наиболее представленных в мембране *B. fragilis* фосфолипида: PC - фосфатидилхолин и PE - фосфатидилэтаноламин, а также основные компоненты ЛПС (липид А и полисахаридные цепи 8 основного сахара (PSC)).

Согласно расчетам гидрофобные взаимодействия вносят значительный вклад ($\Delta G_{\text{nonpolar}}$) в значение энергии связывания при образовании комплекса для обоих белков (mBFT2 и pBFT2) с PC и PE, а также липидом А. Таким образом, гидрофобные остатки жирных кислот липидов взаимодействуют с аминокислотными остатками, формирующими борозды в структурах обоих белков, образуя опосредованную высокой энергией связывания ассоциацию липидов и белка (**Таблица 1**).

Липид А, в качестве основного компонента ЛПС, также образует водородные связи с аминокислотными остатками в бороздке mBFT2. При этом молекула липида А содержит в два раза большее количество остатков жирных кислот, по сравнению с PE и PC, и, следовательно, вносит значительный вклад в гидрофобную составляющую комплексообразования.

Таблица 1 Расчетные энергии связывания для лигандов. PC-фосфатидилхолин, PE-фосфоэтаноламин, PSC – полисахаридная цепь, липид А, ΔG_{bind} – энергия связывания, ΔG_{el} – энергия Кулоновского взаимодействия, ΔG_{polar} – энергия сольватации, $\Delta G_{nonpolar}$ – энергия неполярного взаимодействия (гидрофобное), $T\Delta S$ – энтропия

	Лиганды	ΔG_{bind} (Ккал /моль)	ΔG_{el} (Ккал /моль)	ΔG_{polar} (Ккал /моль)	$\Delta G_{nonpolar}$ (Ккал /моль)	$T\Delta S$ (Ккал /моль)
mBFT2	PE	-11,21	-17,51	15,17	-13,37	-4,50
	PC	-5,86	-11,45	14,85	-14,46	-5,20
	Липид А	-10,68	-9,80	15,20	-24,30	-8,22
	PSC	-8,94	-14,04	15,76	-16,68	-6,02
	PE	-7,78	-5,44	8,21	-16,97	-6,42
pBFT2	PC	-6,90	3,15	2,91	-19,78	-6,82

Помимо возможностей у всех указанных лигандов формировать комплексы со зрелой формой токсина, важнейшим наблюдением стало обнаружение координационных связей, возникающих между кислородами, входящими в состав не эфирных фосфатных групп PC и PE, липида А и PSC и ионом цинка в активном центре mBFT2.

Флуоресцентное тушение и ЯМР для определения природы формирования белково-липидных комплексов

Для проверки гипотезы о формировании белок-липидных комплексов были выбраны методы тушения флуоресценции белка и ЯМР. В ходе эксперимента по тушению флуоресценции белка в качестве контролей была использована белок-липидная пара, для которой показано отсутствие указанных взаимодействий (Протеиназа К). Характеристическая флуоресценция белка контролировалась в максимуме эмиссии Trp / Tug при длине волны 295 нм или 280 нм в присутствии повышающейся концентрации PC, организованного в липидные слои посредством обращенно-фазового выпаривания. В результате было показано формирование белок-липидных комплексов в соотношении 1:1 в буфере с низким значением ионной силы и образование mBFT2-липидных комплексов в соотношении 3:1 в стандартном PBS. Для оценки степени влияния координационных связей на процесс формирования белок-липидных комплексов, дополнительно были получены мутантные рекомбинантные формы незрелого (pBFT2-MUT) и процессированного токсина (mBFT2-MUT). В активном центре белка была произведена

замена гистидинового тракта на тирозиновый, не взаимодействующего с ионом цинка. Однако обе мутантные формы продемонстрировали повышенное сродство к РС, что может быть связано с их повышенной гидрофобностью и наличием разницы в заряде гистидина по отношению к тирозину (**Рисунок 6**).

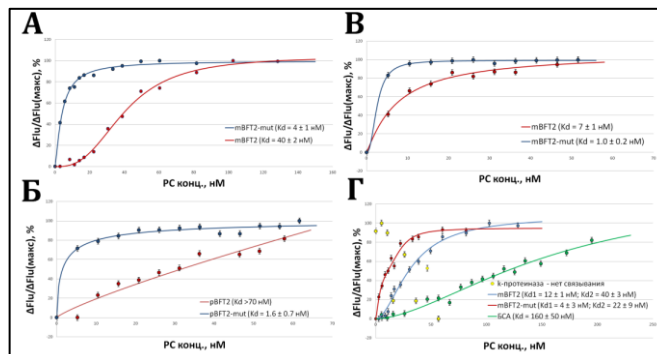


Рисунок 6 Тушение флюоресценции белка в ходе формирования комплексов с липидными слоями, построенными из РС. Условия: стандартный фосфатно-солевой буфер (Б,В) или буфер, содержащий ионы Zn^{2+} (А,Г). Длина волны возбуждения – 295 нм (А,Б) или 280 нм(В,Г). Концентрация белка, взятая для эксперимента – 3 нМ. Стандартное отклонение измерено для трех биологических повторов(Данные получены совместно с Варижук А.М., сотрудником лаборатории искусственного антителогенеза ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России).

Для ЯМР спектроскопии были использованы 5 мкМ каждой формы BFT2 (pBFT2 и mBFT2) и 0.6 мкМ РС, формирующие мицеллы в водном растворе.

Основным наблюдением стало изменение коэффициентов диффузии веществ при формировании комплексов в растворе, а также ширины пиков для остатков жирных кислот РС (**Таблица 2**). Пиковые изменения ширины в данном случае могли быть вызваны только изменением времени релаксации T_2 , т.е. снижением степени подвижности РС при формировании комплекса с белком и, соответственно, изменением конформации.

Таблица 2 Коэффициенты диффузии для компонентов смеси и отдельных веществ

Компоненты смеси	Коэффициент диффузии $D \log (m^2/c)$
pBFT2	-8,4
mBFT2	-8,9
Агрегаты mBFT2	-9.3
РС	-8,2
РС в смеси с mBFT2	-9,1
mBFT2 в смеси с РС	-9
РС в смеси с pBFT2	-8,7
pBFT2 в смеси с РС	-8,6

Биологические эффекты токсин содержащих везикул на культуру клеток НТ-29/С1

Е-кадгерин, являющийся трансмембранным белком, основной домен которого имеет массу 120 кДа, деградирует в присутствие токсина. Согласно полученным данным, токсин ассоциирован с мембраной везикул, поэтому последние были использованы в

эксперименте по обработке культуры НТ-29/С1 для определения ферментативной активности токсина. С помощью иммуноблот анализа с применением антител против Е-кадгерина была продемонстрирована временная зависимость деградации Е-кадгерина и его полное разрушение при обработке токсин содержащими везикулами клеток культуры НТ-29/С1 в течение 2 часов (**Рисунок 7**). Для определения локализации токсина относительно мембраны везикулы, были изготовлены липосомы, построенные из РС, в которые токсин был включен или добавлен снаружи. В ходе эксперимента при обработке культуры НТ-29/С1 липосомами с включенным и добавленным из вне токсином, деградация Е-кадгерина была отмечена только в случае добавления токсина к заранее приготовленным липосомам. Это подтверждало факт поверхностного расположения токсина относительно мембраны везикулы.

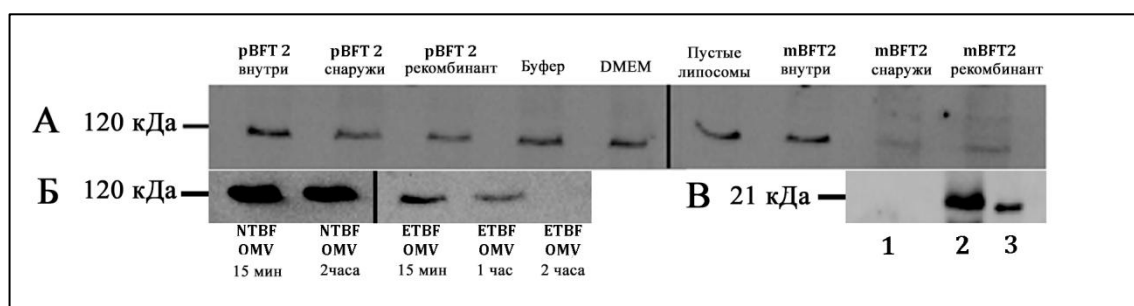


Рисунок 7 Биологические эффекты токсина в составе везикул по отношению к Е-кадгерину в культуре НТ-29. Для оценки степени деградации Е-кадгерина использованы антитела против Е-кадгерина. (А) Биологические эффекты токсина по отношению к Е-кадгерину зависят от его локализации относительно поверхности липосомы. (Б) Биологическое действие токсина, ассоциированного с везикулами по отношению к Е-кадгерину, зависит от времени. (С) Оценка количества незахваченного в липосомы токсина, посредством анализа супернатанта, полученного после ультрацентрифугирования культуральной среды, содержащей липосомы с включенным белком – 1; Оценка количества включенного в липосомы белка – 2; Рекомбинантная форма зрелого белка – 3

Для визуальной оценки распределения везикул, содержащих токсин на поверхности клеток НТ-29, была использована флюоресцентная микроскопия (**Рисунок 8**). Везикулы, выделенные у EBTF и NTBF, а также липосомы с добавленным и включенным в полость токсином окрашивали липофильным DiI красителем и инкубировали в течение 1 часа в культуре клеток НТ-29. В результате сравнительного анализа препаратов клеток, обработанных мечеными ETBF и NTBF везикулами, удалось выявить фиксированные на поверхности клеток везикулы токсигенного штамма и меньшее количество везикул нетоксигенного штамма, что свидетельствует о роли везикул в процессе доставки токсина до клеток-мишеней.

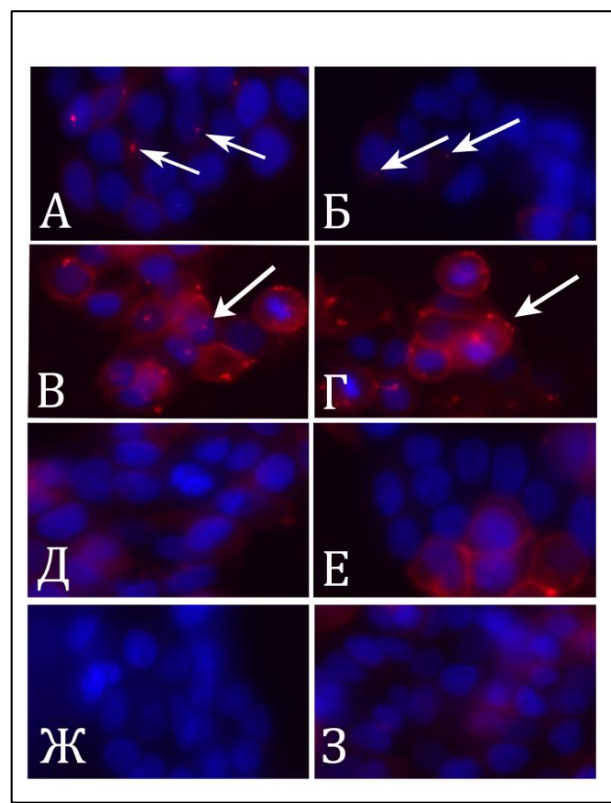


Рисунок 8 Флюоресцентная микроскопия комплексов 3 мкг везикул, изолированных у ETBF - (А), и NTBF - (Б); 12 нМ рBFT2- (В), и 14,2 нМ mBFT2- (Г), добавляли к 100 мкл приготовленных липосом; 14,2 нМ mBFT2- (Д) и 12 нМ рBFT2- (Е), были инкапсулированы в липосомы. (Ж) - 10 мкл VybrantDiI добавляли в фосфатно-солевой буфер и центрифугировали при 100000 g. (З) -100 мкл липосом. Все образцы были помечены VybrantDiI (красный) и далее инкубировали совместно с линией клеток HT-29 в течение 1 часа. Ядра окрашивали DAPI (синий). Стрелки указывают на формирование белково-липидных комплексов, расположенных на поверхности клеток.

Метаболомный анализ везикул и реконструкция метаболических путей

Для анализа метаболома были выбраны наиболее представленные метаболиты клеток, прежде всего вовлеченные в метаболические каскады, ферменты которых были обнаружены в везикулах. Используя стандарты метаболитов, было проведено ВЭЖХ-МС / МС исследование 95 метаболитов, которые высоко представлены в бактериальных клетках. В результате, в везикулах в равной степени были обнаружены компоненты метаболизма аминокислот, нуклеозидов, нуклеотидов, гликолиза, Цикла трикарбоновых кислот и несколько кофакторов. В дополнении к данным, полученным посредством ВЭЖХ-МС/МС, результаты ГХ-МС, позволили выявить окисленные и восстановленные формы свободных жирных кислот.

Для реконструкции метаболических карт было использовано программное обеспечение “Pathways editor”, созданное в ФГБУН “ФНКЦ ФХМ” ФМБА России под руководством Фисунова Г.Ю. Для метаболитов, которые могли бы участвовать в

биохимических реакциях на основании протеогеномной аннотации были предложены ферменты (например, реакция трансформации аргинин / орнитин). Все из обнаруженных промежуточных продуктов и кофакторов реконструированных реакций, а также взаимосвязь каждого пути, были указаны в конечных метаболических картах (Рисунок 9-10).

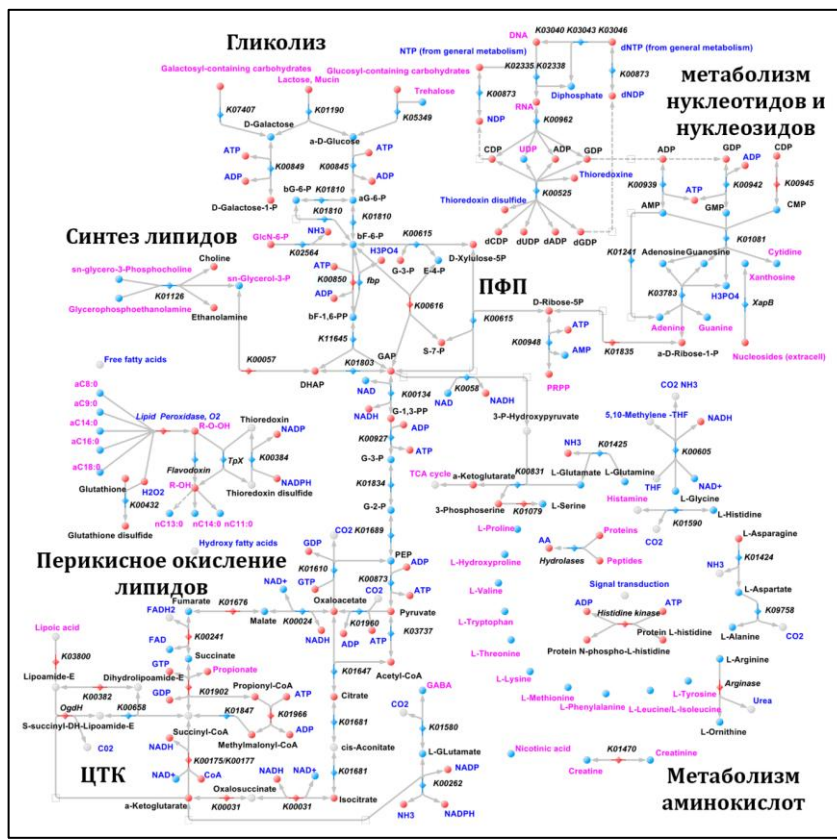


Рисунок 9 Реконструированная метаболическая карта ETBF OMVs. Идентифицированные / не идентифицированные белки представлены в виде шаров, окрашенных в синий / красный. Синие / красные ромбы указывают на идентифицированные / не идентифицированные ферменты. ПФП – пентозофосфатный путь, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот sn-glycero-3-phosphocholine- sn-glycero-3-PC; Glycerophosphoethanolamine-Glycero-3-PE; bG-6-Pb-D-Glucose-6-phosphate; aG-6-Pa-D-Glucose-6-phosphate; bF-6b-D-Fructose-6-phosphate; E-4-PD-Erythrose-4-phosphate; GAPD-Glyceraldehyde-3-phosphate; G-3-PD-Glycerate-3-phosphate; G-2-PD-Glycerate-2-phosphate; G-1,3-PPD-Glycerate-1,3-bisphosphate; dF-1,6-PPb-D-Fructose-6-bisphosphate; S-7-P - D-Sedoheptulose-7-phosphate.

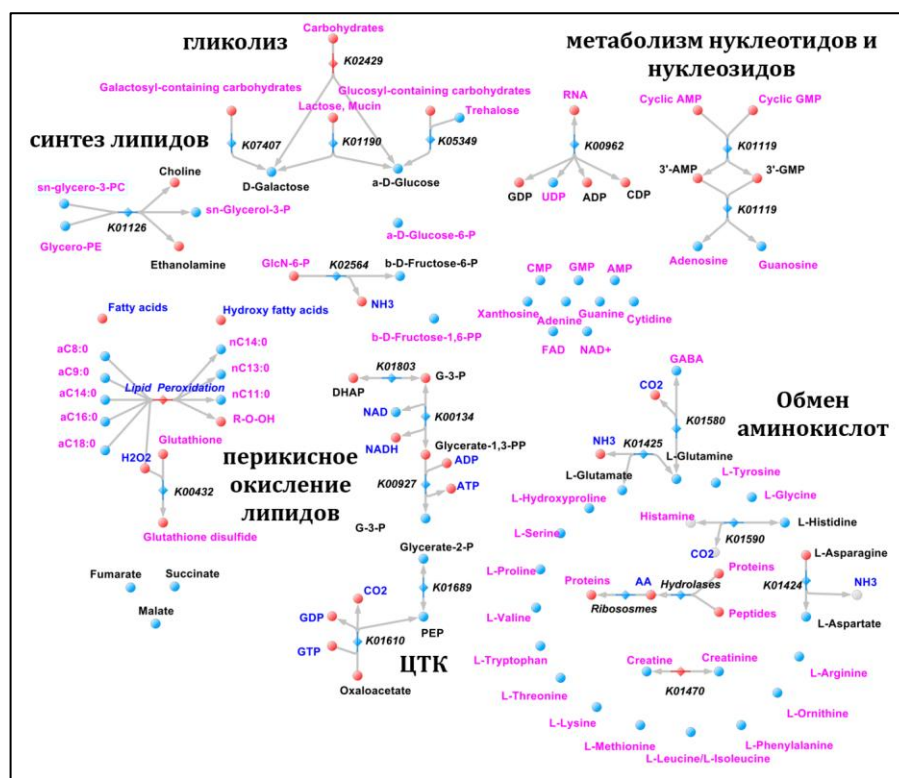


Рисунок 10 Реконструированная метаболическая карта NTBF OMVs. Идентифицированные / не идентифицированные белки представлены в виде шаров, окрашенных в синий / красный. Синие / красные ромбы указывают на идентифицированные / не идентифицированные ферменты. ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

Реконструированная карта для везикул ETVF содержала основные метаболические пути, такие как гликолиз, пентозофосфатный путь, ЦТК, метаболизм аминокислот, обмен пуринов и пиримидинов. В том числе на карту были нанесены реакции синтеза ДНК и РНК, а также выявленные компоненты механизма перекисного окисления липидов. Наиболее заполненными путями в реконструированной карте ETVF везикул, были гликолиз и ЦТК. Кроме того, удалось обнаружить несколько метаболитов, образующихся в цикле трикарбоновых кислот: малат, сукцинат, фумарат и FAD, а также пируваткарбоксилазу и фосфоэнолпируват карбоксикиназу - ферменты, обеспечивающие связь гликолиза с ЦТК.

В сравнении с ETVF метаболом и протеом везикул NTBF не включал компоненты основных путей. Несмотря на отсутствие значимых ферментов, в везикулах NTBF были обнаружены аминокислоты, монофосфо-нуклеотиды и продукты их деградации.

В ходе протеомного и метаболомного анализа везикул ETVF и NTBF и последующей реконструкции биохимических реакций удалось установить наличие заверщенного пути гликолиза в везикулах токсигенного штамма, в отличие от нетоксигенного.

Для оценки активности ферментов указанного пути был использован метод метаболомного анализа с применением изотопно-меченого метаболита (флаксомный анализ). Для этой цели изолированные везикулы обоих штаммов были инкубированы с изотопно-меченой глюкозой - $^{13}\text{C}_6$, с последующим метаболомным анализом изолированных везикул. В результате, изотопно-меченая глюкоза - $^{13}\text{C}_6$, а также продукты ее ферментативной трансформации, такие как $^{13}\text{C}_4$ -D-эритроза-4-фосфат и $^{13}\text{C}_3$ -глицерол-3-фосфат были обнаружены только в ETBF везикулах. Обнаружение изотопно-меченой глюкозы - $^{13}\text{C}_6$ и продуктов ее метаболитов в ETBF везикулах свидетельствовало о наличии активных переносчиков глюкозы в мембране везикул, а также активности биохимических реакций в реконструированной схеме.

Протеомные и метаболомные данные NTBF полностью соответствовали результатам флаксомного анализа, т.е. обнаружить метаболическую активность в NTBF везикулах не удалось.

Выводы

1. Разработан способ получения везикул методом пошаговой фильтрации и ультрацентрифугирования, позволивший провести сравнительный протеомный и метаболомный анализ везикул и обнаружить характерные отличия везикул двух штаммов *B.fragilis*
2. Впервые показано наличие токсина-фрагилизина, ассоциированного с везикулами. Методами ТЭМ с применением антител, меченных золотом, а также иммуоблота, определена локализация токсина в составе мембраны везикулы. Методами компьютерного моделирования, флюоресцентного тушения белка, а также ЯМР показана высокое сродство токсина к фосфолипидам.
3. В ходе экспериментов с использованием культуры клеток HT-29/C1 и токсин-содержащих везикул, показана активность токсина в отношении известного субстрата – белка межклеточных контактов – E-кадгерина. Эксперименты с применением липосом позволили продемонстрировать мембранную ассоциацию токсина с ориентацией активного центра белка во внешнюю среду.
4. Совокупный протеометаболомный анализ, дополненный результатами метаболомного исследования с применением изотопно-меченой глюкозы, позволил определить метаболическую активность везикул токсигенного штамма. Установленный период метаболической активности биохимических реакций, протекающих в везикулах, составил 3 часа.

Заключение

Настоящая работа является первым сравнительным исследованием везикул *B.fragilis*, результатом которой стала всесторонняя оценка биохимического профиля везикул, а также определение механизма секреции и доставки токсина *B.fragilis* до клеток мишеней. Впервые для везикул двух гомологичных штаммов проведено протеомное и метаболомное профилирование, дополненное метаболомным анализом с использованием меченого метаболита, с последующим построением карт метаболической активности. В ходе подробного протеомного анализа везикул подтверждена ранее указанная гидролитическая активность везикул, а также показан новый механизм дистанционной адаптации бактерий к окислительному стрессу, благодаря наличию ферментов класса оксидоредуктаз и белков защиты от окислительного стресса в составе везикул. Показано наличие ферментов основных биохимических реакций в везикулах токсигенного штамма. Впервые для бактериальных везикул выполнено метаболомное профилирование, позволившее получить полное представление о метаболической активности везикул токсигенного штамма. Для везикул нетоксигенного штамма указанная активность не установлена. Согласно данным протеомметаболомного реконструирования, дополненного метаболомным анализом с использованием меченого метаболита, продемонстрирована активность биохимических реакций гликолиза, пентозофосфатного пути, а также синтеза липидов в везикулах токсигенного штамма *B.fragilis*. При инкубации везикул токсигенного штамма с изотопно-меченой глюкозой показана стабильная активность указанных реакций в течение 3 часов.

В работе впервые исследован механизм секреции и доставки токсина *B.fragilis* посредством везикул. Посредством компьютерного моделирования, подтвержденного физико-химическими методами исследования белково-липидных комплексов, такими как флюоресцентное тушение и ЯМР, показано высокое сродство структур мембраны везикулы, включая липиды и белковых молекул токсина. Показана протеолитическая активность токсин-содержащих везикул в отношении известного субстрата - белка межклеточного контакта – E-кадгерина. Согласно экспериментам по локализации токсина, относительно поверхности липосомы, показана его ассоциация со структурами мембраны, таким образом, что активный центр белка обращен наружу. Учитывая данные компьютерного моделирования процессов взаимодействия белка и компонентов мембраны, включая липиды, активный центр токсина содержит остатки длинноцепочных жирных кислот липидов, которые согласно предположению вытесняются из него путем взаимодействия с предполагаемым рецептором на поверхности эпителиальной клетки.

Обилие новых белков, являющихся потенциальными факторами вирулентности, среди которых – пататин, пирин, ряд гемолизинов и др, определенный в составе везикул токсина, а также выявленная ферментативная активность целого ряда биохимических реакций позволяет утверждать роль везикул токсигенного штамма в дистанционной патогенной активности к отношению эпителиальных клеток, в отличие от везикул нетоксигенного штамма. Данная работа открывает перспективы дальнейшего исследования патогенеза и выработки направлений терапии инфекционных заболеваний, вызванных токсигенным *B.fragilis*.

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Zakharzhevskaya N.B.**, Tsvetkov V.B., Vanyushkina A.A., Varizhuk A.M., Rakitina D.V., Podgorsky V.V., Vishnyakov I.E., Kharlampieva D.D., Manuvera V.A., Lisitsyn F.V., Gushina E.A., Lazarev V.N., Govorun V.M.. Interaction of *Bacteroides fragilis* toxin with outer membrane vesicles reveals new mechanism of its secretion and delivery // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. – V.7(№ 2). doi: 10.3389/fcimb.2017.00002.
2. **Zakharzhevskaya N.B.**, Vanyushkina A.A., Altukhov I.A., Shavarda A.L., Butenko I.O., Rakitina D.V., Nikitina A.S., Manolov A.I. , Fisunov G.Y., Govorun V.M.. Outer membrane vesicles secreted by pathogenic and nonpathogenic *Bacteroides fragilis* represent different metabolic activities // *Sci Rep.* – 2017. – V.7 (№ 1). doi: 10.1038/s41598-017-05264-6.
3. **Захаржевская Н.Б.**, Бабикова Е.А., Генерозов Э.В., Щербаков П.Л., Парфенов А.И., Хатьков И.Е., Каграманова А.В.; Современные принципы скрининга, диагностики и терапии колоректального рака // *Терапевтический архив.* – 2016. №88. – С.90-96.

Материалы российских и международных конференций:

4. **Захаржевская Н.Б.**, Цветков В.Б., Ванюшкина А.А., Варижук А.М, Ракитина Д.В., Подгорский В.В., Вишняков И.И., Лисицин Ф.В., Гущина Е.А., Говорун В.М.Определение механизма секреции и доставки токсина патогенного штамма *Bacteroides fragilis* к эукариотическим клеткам // *Acta Naturae.* – 2016. – С. 2-89
5. **Захаржевская Н.Б.**, Ванюшкина А.А., Бутенко И.О, Алтухов И.А., Фисунов Г.Ю., Говорун В.М..Метаболическая активность везикул *Bacteroides fragilis* // *Эфферентная и физико-химическая медицина.* - 2016. - №12. - С. 6

6. Ванюшкина А.А., **Захаржевская Н.Б.**, Бутенко И.И., Алтухов И.А. Метаболомное и протеомное профилирование везикул *bacteroides fragilis* // Эфферентная и физико-химическая медицина. - 2015. - №12.- С. 4
7. **Захаржевская Н.Б.**, Цветков В.Б., Ванюшкина А.А., Варижук А.М., Ракитина Д.В., Подгорский В.В., Вишняков И.И., Лисицин Ф.В., Гущина Е.А., Говорун В.М.Определение механизма секреции и доставки токсина патогенного штамма *bacteroides fragilis* к эукариотическим клеткам // Эфферентная и физико-химическая медицина. - 2015. - №12. - С. 16
8. Ванюшкина А.А., **Захаржевская Н.Б.**, Бутенко И.И., Алтухов И.А. Метаболомное и протеомное профилирование везикул *Bacteroides fragilis* // *Acta Naturae*. – 2016. - № 2. – С.119
9. **Zakharzhevskaya N.B.**, Harlampieva D.D., Pobeguts O.V., Lazarev V.N., Govorun V. M. Induction of cell responses to the endogenous expression of *Bacteroides fragilis* toxin in culture HEK-293 // *FEBS*. - 2016. - Volume 2. – Issue 89. – P.617
10. **Захаржевская Н.Б.**, Гущина Е.А., Вишняков И.А, Говорун В.М. Везикулы, как механизм транспорта токсина *Bacteroides fragilis* в окружающую среду // Сборник трудов IV международной научно-практической конференции “Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине” Казань, Россия. - 2014. - С.212
11. Vanyushkina A.A., **Zakharzhevskaya N.B.**, Altukhov I.A., Butenko I.O., Govorun V.M.. System proteometabolomic profiling of bacterial vesicles // *Metabolomics*. – 2016. - Volume 6. Issue 3.