

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ  
МЕДИЦИНЫ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»**

---

*На правах рукописи*

**ЗАХАРЖЕВСКАЯ НАТАЛЬЯ БОРИСОВНА**

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

03.01.04 – Биохимия

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
Академик РАН, профессор, д.б.н. Говорун В.М.

Москва 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР</b> .....	10
1.1 Общая характеристика рода <i>Bacteroides</i> .....	10
1.2 Структура и функции везикул грамотрицательных бактерий .....	15
1.3 Факторы вирулентности и токсины, ассоциированные с везикулами .....	17
1.4 Особенности везикулярного трафика у <i>B.fragilis</i> .....	23
1.5 Регуляция иммунного ответа посредством везикул <i>B.fragilis</i> .....	25
1.6 <i>B.fragilis</i> – оппортунистический патоген .....	27
1.7 Протеолитическая активность фрагилизина.....	29
1.8 Заключение.....	31
<b>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	32
2.1 Бактериальные штаммы и клеточные культуры .....	32
2.2 Антитела .....	32
2.3 Химические реагенты.....	33
2.4 Выделение везикул .....	34
2.5 Электронная микроскопия препарата везикул и клеток .....	34
2.6 Фракционирование клеточного лизата.....	34
2.7 Геномное сравнение штаммов.....	35
2.8 Выделение белка и электрофорез .....	36
2.9 Протеомное исследование везикул методом ВЭЖХ-МС/МС .....	36
2.9.1 Пробоподготовка .....	36
2.9.2 Параметры измерения для протеомного анализа везикул .....	37
2.9.3 Идентификация белков и пептидов .....	37
2.10 Протеогеномный анализ .....	38
2.11 Метаболомный анализ с использованием ВЭЖХ-МС/МС метода .....	38
2.11.1 Пробоподготовка .....	38
2.11.2 Параметры детекции метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС.....	39
2.11.3 Интерпретация результатов .....	40
2.11.4 Статистическая обработка результатов метаболомного анализа.....	40

2.12	Метаболомика ГХ-МС .....	41
2.12.1	Пробоподготовка .....	41
2.12.2	Параметры детекции метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС .....	41
2.12.3	Интерпретация результатов .....	41
2.13	Реконструкция метаболических карт везикул .....	42
2.14	Анализ активности биохимических реакций с применением изотопно-меченого метаболита .....	42
2.15	Определение локализации токсина .....	43
2.15.1	Вестерн-блот гибридизация .....	43
2.15.2	Электронная микроскопия с применением антител против токсина, меченых золотом .....	43
2.16	Липидное исследование мембраны и ЛПС .....	44
2.16.1	Липидная экстракция .....	44
2.16.2	Исследование компонентов мембраны методом прямого ввода образца	44
2.17	Компьютерное моделирование взаимодействия токсина со структурами везикул .....	45
2.18	Физико-химические методы для оценки природы ассоциации токсина и структур везикулы .....	46
2.19	Биологические методы для оценки природы взаимодействия токсина и везикулы .....	48
2.19.1	Флюоресцентная микроскопия .....	48
2.19.2	Эксперименты по протеолитическому расщеплению E-кадгерина посредством везикул .....	48
2.19.3	Эксперименты по протеолитическому расщеплению E-кадгерина с применением модели искусственных липосом .....	49
2.19.4	Геммаглютинация .....	50
<b>3</b>	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	<b>51</b>
3.1	Выбор оптимальной фазы роста бактерий для выделения везикул .....	51
3.2	Электронная микроскопия бактериальных срезов и препаратов везикул ..	52
3.3	Генетический анализ исследуемых бактериальных штаммов .....	54
3.4	Сравнительное протеомное исследование везикул .....	56

3.4.1	Структурные белки и их сублокализации .....	57
3.4.2	Ферменты и метаболические пути .....	63
3.4.3	Факторы патогенности и вирулентности.....	68
3.5	Идентификация токсина методами вестерн блота и электронной микроскопии с применением антител против токсина, меченых золотом .....	71
3.6	Липидомное исследование .....	76
3.7	Компьютерное моделирование процессов взаимодействия токсина со структурами мембраны везикулы .....	81
3.8	Физико-химические методы для подтверждения результатов компьютерного моделирования.....	89
3.8.1	Флюоресцентное тушение.....	89
3.8.2	ЯМР.....	91
3.9	Биологические эксперименты для определения локализации токсина и его протеолитической активности .....	93
3.9.1	Времязависимая протеолитическая деградация E-кадгерина .....	93
3.9.2	Опосредованная локализацией токсина деградация E-кадгерина .....	95
3.9.3	Флюоресцентная микроскопия препарата везикул и токсин-содержащих липосом.....	96
3.9.4	Тест на геммаглютинацию .....	98
3.10	Сравнительное метаболомное исследование везикул .....	99
3.11	Реконструкция метаболических реакций, протекающих в обоих штаммах	104
3.12	Метаболомное исследование с применением изотопно-меченого метаболита .....	110
<b>4.</b>	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	<b>112</b>
<b>5.</b>	<b>ВЫВОДЫ</b> .....	<b>114</b>
<b>6.</b>	<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	<b>115</b>
<b>7.</b>	<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>117</b>
<b>8.</b>	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b> .....	<b>132</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность работы

Современная микробиология базируется на основных направлениях молекулярной биологии, включающих геномику, транскриптомику, протеомику и метаболомику. Методы физико-химического анализа дополняют и расширяют представления о физиологии и особенностях межклеточных коммуникаций внутри бактериальных сообществ. В этой связи, всестороннее изучение микроорганизмов, населяющих желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) и являющихся основой микрофлоры кишечника, может способствовать расширению фундаментальных знаний, а также определит новые терапевтические мишени для лечения и профилактики заболеваний, вызванных патогенными бактериями.

Микрофлора ЖКТ представлена значительным разнообразием микроорганизмов, большинство из которых являются анаэробами. При этом род *Bacteroides* занимает 25% всех анаэробных бактерий [1]. Являясь грамотрицательными, неспорообразующими палочками, бактерии данного рода входят в состав нормальной микрофлоры кишечника, активно участвуя в процессах сбраживания углеводов и биотрансформации желчных кислот [2]. Однако среди представителей рода *Bacteroides* имеется уникальный, полярный по своим свойствам по отношению к организму хозяина вид – *Bacteroides fragilis*. Если непатогенные штаммы данного вида (NTBF), как и все остальные виды рода *Bacteroides*, способствуют ферментации углеводов, а также характеризуются симбиотическими взаимодействиями с организмом хозяина, то патогенные или токсин продуцирующие штаммы (ETBF) приводят к развитию воспалительной патологии ЖКТ, включая рак толстой кишки [3-6]. Еще в 1984 году в ходе бактериального профилирования образцов ткани и кала новорожденных ягнят, у которых была отмечена острая диарея, основным бактериальным видом был определен *B. fragilis* [7]. Myers L. L. с коллегами продемонстрировали нарушение работы ЖКТ с явлениями накопления жидкости в области петель кишечника. Позднее был выявлен специфический токсин, названный фрагилизин (BFT –

*Bacteroides fragilis* toxin), действие которого и определяло описанные явления [8]. Однако, несмотря на результаты исследований, посвященных изучению субстратной специфичности токсина, определению механизма его секреции и доставки, на сегодняшний день не существует данных, способных совокупно описать все упомянутые процессы [9-16]. Кроме того, продолжительное время существовала экспериментально подтвержденная версия протеолитической активности BFT в отношении клеточного субстрата – E-кадгерина [14]. Основным механизмом действия сводился к специфическому протеолитическому расщеплению данного белка, с ответным запуском Wnt-каскада в эпителиальных клетках и последующей воспалительной реакцией с явлениями эксфолиации эпителия [17]. Однако, описанный механизм был, частично, опровергнут. В экспериментах с рекомбинантной формой E-кадгерина было продемонстрировано отсутствие протеолитической активности в отношении данного субстрата [18]. Более того, в ходе работы Wu и соавторов удалось обнаружить взаимодействие BFT со специфическим рецептором на поверхности клеток эпителия, что способствовало опосредованной деградации E-кадгерина [19]. Вплоть до 2016 года никакой информации, позволяющей хоть как то пролить свет на особенности созревания, доставки и наличие конкретной мишени протеолитической активности BFT не было. Однако в мае 2016 года Choi и соавторам удалось определить белок, участвующий в процессе созревания токсина [20].

Если для большинства патогенных бактерий известны механизмы секреции, вырабатываемых ими токсинов, то для *B. fragilis* на сегодняшний день не определены точные механизмы. [21]. Исследование генома *B. fragilis* помогло определить гены, ответственные за формирование VI типа бактериальной секреции [22]. Однако, данный способ не является распространенным, с позиции секреции множества веществ, и ориентирован, скорее, на вполне конкретную группу белков, которые удалось определить [23]. Примечательно, что среди них не оказалось упомянутого токсина. Однако другой, более древний способ бактериальной секреции - внешнемембранные везикулы, на сегодняшний день, представляются наиболее вероятным и доступным вариантом секреции веществ у

*B.fragilis*, включая факторы вирулентности и патогенности, среди которых может оказаться и токсин [24]. Для значительного числа токсинов различных видов патогенных бактерий уже описаны варианты доставки их факторов вирулентности посредством везикул [25-30]. Уникальные свойства, а именно структура ВФТ с множеством гидрофобных зон, опосредует возможность не только специального, т.е. сопряженного с конкретным механизмом, но и случайного попадания токсина в состав везикулы [31].

Учитывая, что на сегодняшний день сравнительное исследование состава везикул ETBF и NTBF еще не было проведено, а также тот факт, что везикулы могут являться механизмом не только секреции, но и доставки токсинов до клеток – мишеней, данная работа представляется актуальной по двум основным направлениям, таким как, исследование полного биохимического профиля везикул с одной стороны, а также определение механизма секреции и доставки токсина *B.fragilis* с другой.

Исследование биохимического профиля везикул позволит существенно обогатить имеющиеся на сегодняшний день знания о составе и функциональной активности везикул *B. fragilis*. В мировой литературе имеется лишь нескольких работ, позволяющих оценить протеомный профиль везикул NTBF [3, 32]. Однако сравнительный системный анализ, базирующийся на методах геномного, протеомного и метаболомного профилирования двух типов бактерий, включая клинически значимый патогенный изолят, открывает перспективы выявления новых факторов вирулентности. Кроме того, способствует формированию новых гипотез об особенностях адаптации патогенных микроорганизмов посредством везикул, в ходе инфекции и последующей персистенции. Полный биохимический профиль везикул позволит предположить варианты осуществления межклеточной коммуникации, обуславливающей различные типы взаимоотношений, включая симбиоз, комменсализм и паразитизм.

Второе направление позволит установить механизм секреции и доставки токсина. Учитывая, что для таких бактерий как *Helicobacter pylori* и *Vibrio cholerae* уже показаны механизмы секреции токсинов посредством везикул, а

также тот факт, что для *B. fragilis* не определены иные варианты бактериальной секреции, представляется наиболее вероятным возможность секреции и доставки фрагилиза посредством везикул [25, 33].

### **Цель работы**

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

### **Задачи работы:**

1. Разработать метод получения и анализа 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 и реконструировать карты метаболической активности везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов *B. fragilis*.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

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 [1, 34]. Однако, патогенные бактерии способствуют развитию тяжелых воспалительных заболеваний, приводящих к дисфункции клеток ЖКТ [35]. Учитывая факт отсутствия 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, как наиболее вероятных структур, используемых бактериями обоих штаммов для реализации, с одной стороны потенциала симбиотического и комменсального взаимодействия, в случае непатогенного штамма, с другой – паразитического, в случае патогенного штамма *B. fragilis*.

Впервые, в данной работе проведена комплексная, сравнительная, протеогеномная и метаболомная аннотация, входящих в состав везикул обоих штаммов *B. fragilis* белков и метаболитов. Методом флаксомного анализа подтверждены активности реконструированных на основе комплексного протеометаболомного профилирования метаболических реакций. Методами электронной микроскопии с применением антител к токсину, меченых золотом, а также иммуоблота, 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 EBTF ферментов и потенциальных факторов вирулентности, будет исследовано для проверки ряда гипотез по особенностям межклеточных коммуникаций и адаптации бактерий в организме хозяина.

Явление взаимодействия токсина с мембраной везикулы, подтвержденное физико-химическими методами анализа, может определить основу для формирования нового типа антимикробных препаратов. Основное действие созданных препаратов, может заключаться в таргетном влиянии 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. Патогенные и непатогенные штаммы *B. fragilis* 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 меченого метаболита, позволяет утверждать наличие активных биохимических реакций, протекающих преимущественно в везикулах ЕВТФ, что, опосредовано необходимостью длительной персистенции и адаптации патогена в организме хозяина.
3. 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. Ассоциация токсина с липидами определяется гидрофобными взаимодействиями, способствующими фиксации токсина в мембране везикулы и последующей его доставке к клеткам-мишеням
5. Токсин в составе везикул ЕВТФ способствует агрегации последних и увеличивает адгезию к клеткам линии НТ-29, что способствует увеличению локальной концентрации токсина на поверхности клеток-мишеней
6. Везикулы ЕТВФ содержат активную форму токсина, которая действует опосредованно на известный субстрат - Е-кадгерин – белок клеточного контакта, приводя к его деградации.

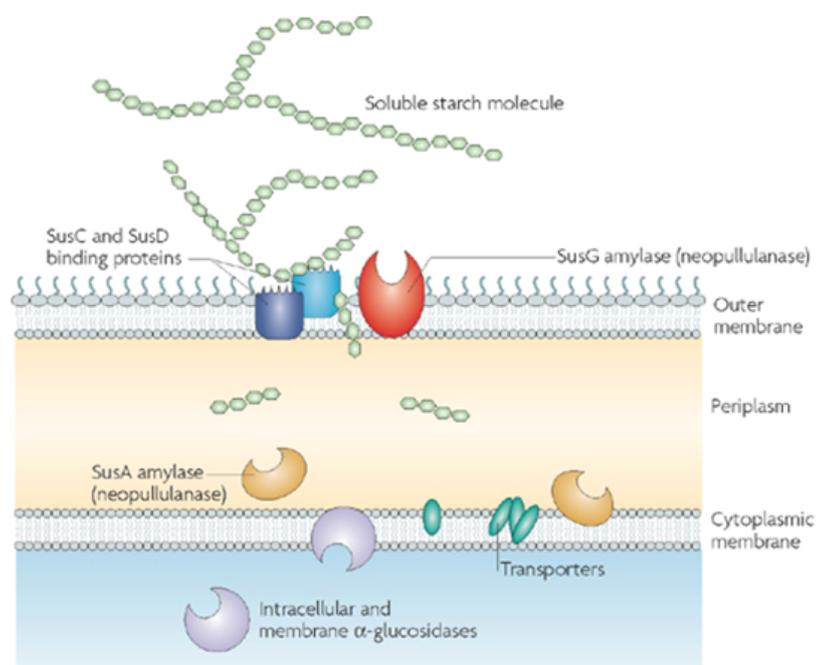
## **1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**

### **1.1 Общая характеристика рода *Bacteroides***

Колонизация организма человека бактериями проходит в момент рождения и продолжается на протяжении первых лет жизни [36]. В ходе развития организма, популяция бактерий, населяющих толстую кишку, становится наиболее многочисленной и многовидовой из всех представленных в организме человека, при этом большинство микроорганизмов являются анаэробами, а более чем 25 % относятся к представителям рода *Bacteroides* [1]. Виды данного рода являются грамотрицательными, неспорообразующими палочковидными бактериями, устойчивыми к воздействию солей желчных кислот [37-39]. Отдельные представители рода, такие как *Bacteroides fragilis* формируют плотную капсулу, значительно превышающую размер клетки [39]. Исследования представителей рода *Bacteroides*, позволили определить целый ряд уникальных, функциональных особенностей их жизнедеятельности и механизмов взаимодействия с организмом хозяина. В частности, было показано, что бактерии рода *Bacteroides* являются активными участниками процесса пищеварения, способствующими сбраживанию углеводов, протеолитической деградации белков, а также биотрансформации желчных кислот [3].

Одна из наиболее значительных функций, известная для рода *Bacteroides* – гидролиз разветвленных, высокомолекулярных полисахаридов, обуславливает его неоспоримую пользу, как для организма хозяина, так и для бактерий других видов. Ферментативное расщепление липополисахаридов приводит к формированию свободных жирных кислот, реабсорбирующихся для последующего включения в метаболизм организма хозяина [40]. Кроме того, *Bacteroides* формируют взаимоотношения с другими бактериальными видами, по типу комменсализма. Так *B. thetaiotaomicron* является донором сиаловых кислот для *C. difficile* и *S. Typhimurium* [41, 42]. В ходе гидролиза полисахаридов муцина, локализованного на поверхности эпителиальных клеток, формируются отдельные гликаны, сиаловые кислоты, а также простые сахара, которые активно поглощаются бактериями, лишенными необходимых ферментов [43]. Некоторые виды, такие как *Bacteroides fragilis*, могут использовать для питания

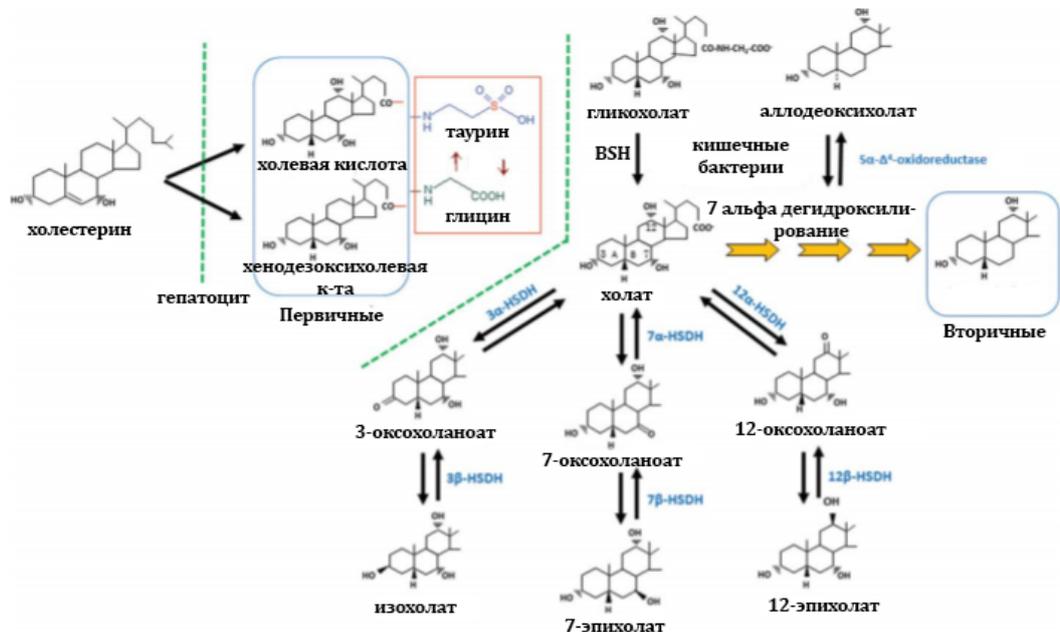
поверхностные гликопротеины и гликолипиды клеток хозяина, состоящие из галактозы и маннозы, а также более сложные соединения, такие как N-ацетил-D-глюкозамин и N-ацетилнейраминовая кислота. Однако, механизмы утилизации полисахарида у *B. fragilis* в должной степени не изучены [2]. Так, в работе Wexler Н. М. и соавторов было показано наличие двухкомпонентной системы, включенной во внешнюю мембрану, состоящей из белков Omp120 и Omp70, гомологичных белкам SusD и SusC в мембране *B. thetaiotaomicron* (Рисунок 1). Данная группа белков участвует в транспорте и последующей утилизации полисахаридов [2, 44].



**Рисунок 1** Двухкомпонентная система, участвующая в транспорте и утилизации полисахаридов. SusC и SusD два белка, ответственные за связывание молекул крахмала на поверхности клетки. Ограниченный гидролиз SusG сопровождается более обширным гидролизом в периплазме и поглощением олигосахаридов через цитоплазматическую мембрану. (Flint Н. J. и соавторы)

Одна из важнейших функций, описанных для рода *Bacteroides* - конъюгация солей желчных кислот (Рисунок 2). *Bacteroides* используют для этого процесса арсенал гидролаз, например, группу холаилглицин гидролаз [38]. Обезопасив себя от агрессивного воздействия желчи, представители рода *Bacteroides* способствуют созданию благоприятной среды для других бактериальных типов [45]. В целом,

бактерии, населяющие ЖКТ, способны выполнять многочисленные биотрансформации солей желчных кислот в процессе их энтерогепатической циркуляции. Основные биотрансформации включают в себя: гидролиз конъюгированных желчных кислот до свободных желчных кислот и глицина или таурина, с помощью гидролазы солей желчных кислот (BSH);  $7\alpha$ -дегидроксилирование холевой и хенодезоксихолевой кислоты до дезоксихолевой и литохолевой кислоты, соответственно;  $7\beta$ -дегидроксилирование желчных кислот до урсодезоксихолевой кислоты. Важно, что  $7\alpha/7\beta$ -дегидроксилирование происходит только у анаэробов, при этом обнаружен данный процесс среди грамотрицательных бактерий только у *Bacteroides* [46]. Кроме того, представители *Bacteroides* способны к окислению и эпимеризации гидроксильных групп желчных кислот в C3, C7 и C12 положениях, способствующих формированию значительного количества вариантов ( $\beta$ -гидрокси) кислот [47].

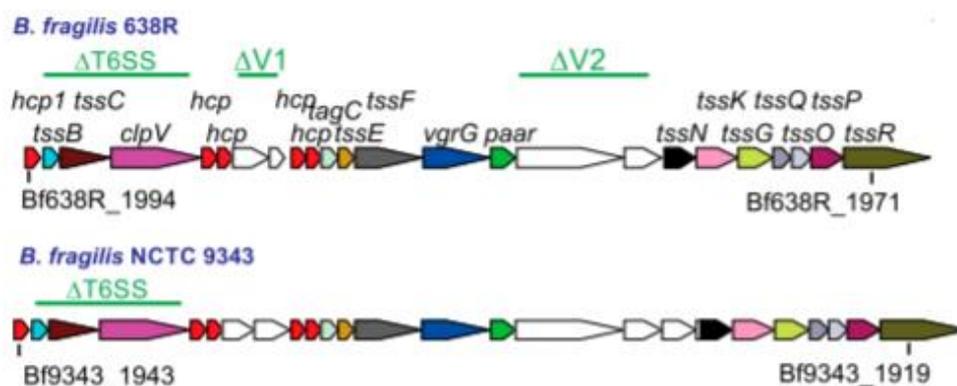


**Рисунок 2** Синтез в печени и последующая биотрансформация желчных кислот, осуществляемая кишечными бактериями. BSH-гидролаза солей желчных кислот;  $3\alpha$ -HSDH- $3\alpha$ -гидроксистероиддегидрогеназа;  $3\beta$ -HSDH- $3\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа;  $7\alpha$ -HSDH- $7\alpha$ -гидроксистероиддегидрогеназа;  $7\beta$ -HSDH- $7\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа;  $12\alpha$ -HSDH- $12\alpha$ -гидроксистероиддегидрогеназа;  $12\beta$ -HSDH- $12\beta$ -гидроксистероид-дегидрогеназа (J. M. Ridlon и соавторы)

Однако, несмотря на уникальные свойства, позволяющие представителям рода *Bacteroides* занимать необходимую нишу среди других бактериальных типов, населяющих ЖКТ, они оказались лишенными значительного арсенала потенциально необходимых механизмов секреции. На сегодняшний день известно 6 типов бактериальной секреции, которые активно используются бактериями для реализации патогенного потенциала, а также для осуществления межклеточных коммуникаций [48-50].

Однако до недавнего времени, для *Bacteroides* выявить подобные варианты не удавалось [21]. Лишь в последнее время в результате работы проф. Соупе и соавторов, а позже и экспериментально, удалось обнаружить VI тип бактериальной секреции у данных микроорганизмов [22, 23]. Стоит отметить, что в отличие от других вариантов, данный способ секреции используется строго для межклеточной коммуникации между бактериями и/или клетками организма хозяина [51]. В ходе работы исследователям удалось выявить небольшой спектр специфичных белков, которые могут выделяться при подобном взаимодействии. Среди возможных кандидатов определены белки, способствующие развитию иммунного ответа организма хозяина и ряд сигнальных белков, для межбактериальной коммуникации [23]. Для *B.fragilis* удалось картировать и в последующем определить функциональные характеристики генов, ответственных за синтез белков, входящих в комплекс бактериальной секреции VI типа (**Рисунок 3**).

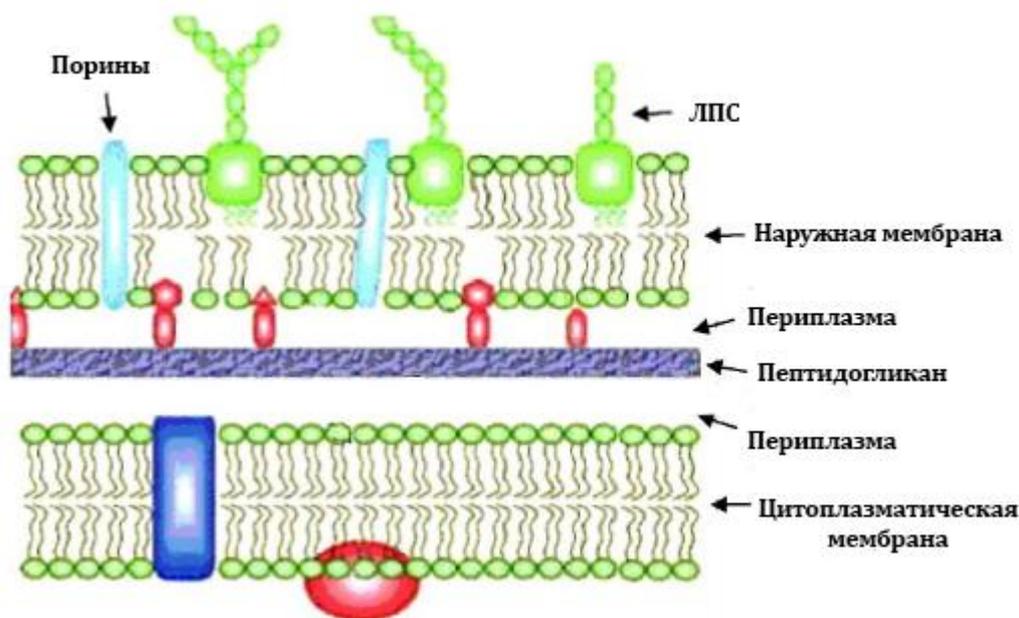
Подробный анализ геномов продемонстрировал наличие ряда генов, ответственных за синтез белков бактериальной секреции I и II типа [52]. Однако, эти данные экспериментально подтверждены не были. Наличие или отсутствие специализированных систем секреции, тем не менее, не отменяет уникального свойства, описанного для всех грамотрицательных, а в последнее время и для грамположительных бактерий, - секреции внешнемембранных везикул. Согласно последним данным, везикулы остаются наиболее вероятным способом секреции для *Bacteroides* [53].



**Рисунок 3** Гены ответственные за формирование VI типа бактериальной секреции у *B. fragilis*. На рисунке представлено сравнение генов, кодирующих VI тип секреции у двух лабораторных штаммов *B. fragilis* 638R и *B. fragilis* 9343. Карты локусов GA3 T6SS штаммов 9343 и 638R *B. fragilis*. Регионы с 95% -ной или большей идентичностью ДНК между локусами GA3 T6SS показаны как красные линии над картами рамок считывания с пронумерованными разрывами, представляющими две варибельные области между локусами GA3 T6SS. Гены в варибельных областях отмечены белым цветом. Области, удаленные в различных мутантах, показаны над картами открытых рамок считывания зелеными линиями. (Maria Chatzidaki-Livanis и соавторы, 2016)

## 1.2 Структура и функции везикул грамотрицательных бактерий

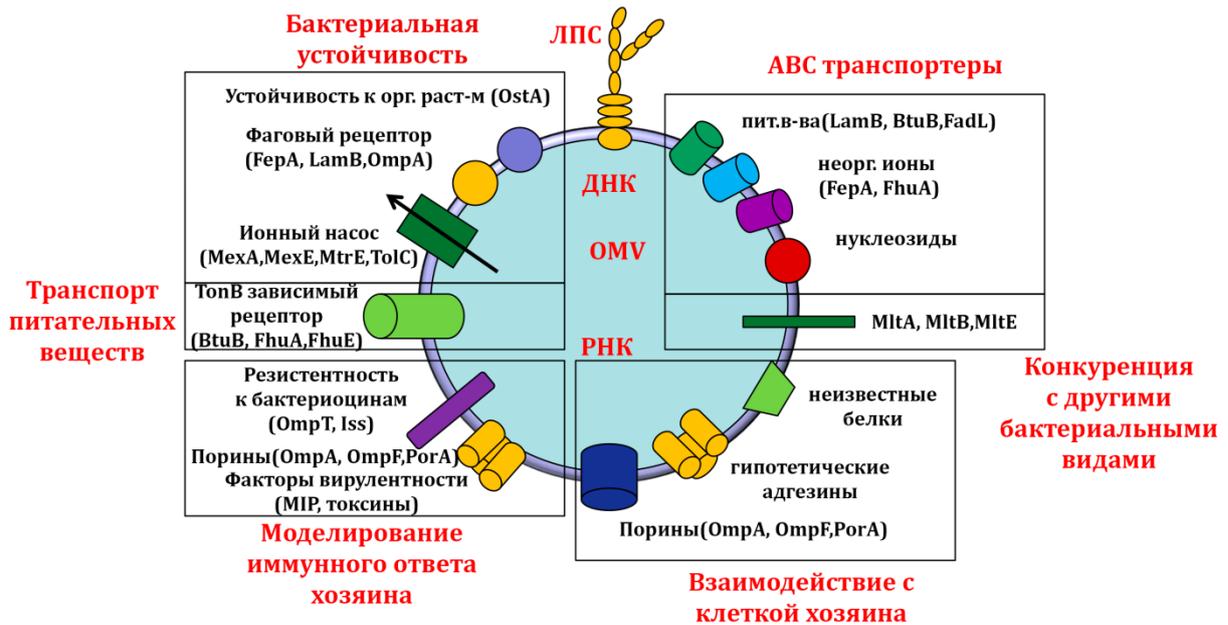
Везикулы, являющиеся моноламиллярной структурой, построенные из компонентов внешней мембраны бактерии, образуются на поверхности мембраны грамотрицательных бактерий (**Рисунок 4**) [54]. Белковая часть внешней мембраны содержит рецепторы, порины, а также белки клеточной адгезии. Липидная часть представлена ассиметрично распределенными фосфолипидами, липопротеинами, а также гликолипидами, основной частью которых является липополисахарид (ЛПС). ЛПС, пронизывающий всю толщину внешней мембраны, образован липидом-А, коровым полисахаридом, построенным из внутреннего и наружного сахарного остова, а также О-антигена, представленного полисахаридными цепями, ответственными за специфическое бактериальное узнавание. Структура О-антигена строго специфична для каждого бактериального типа [55].



**Рисунок 4** Строение мембраны грамотрицательных бактерий

Внешнюю мембрану от внутренней отделяет гель-подобная периплазма, содержащая тонкий слой пептидогликана (4 нм). Пептидогликан непосредственно контактирует с внешней мембраной, за счет образования множественных белок-белковых связей, а также белков, образующих секреторные пути. Известны три основных липопротеина, вовлеченных в секреторный путь: Omp1, OprL и OprF, которые непосредственно обеспечивают связь внешней мембраны и пептидогликана периплазмы [56]. Интегральные белки внешней мембраны также включают OmpA, OmpC, OmpF и другие, способствующие поддержанию стабильности трехмерной структуры мембраны. Данные белки непосредственно взаимодействуют с пептидогликаном и белками, осуществляющими транспортную функцию, такими как TonB, TonA, TolA, также располагающимися во внутренней мембране [57].

Везикула, образованная внешней мембраной грамотрицательной бактерии, включает ЛПС, а также часть периплазмы, с входящими в ее состав белками (Рисунок 5). Белковая часть мембраны везикулы образована внешнемембранными белками OMP, LamB и др., а также рядом белков, ответственных за сигналинг и клеточный транспорт, таких как OmpC, OmpF, NmpC, OmpX, OmpA, LppA, LppB, Pal, TolB [57].



**Рисунок 5** Строение везикулы грамотрицательной бактерии. На рисунке представлены основные функциональные блоки, характеризующие белки мембраны везикулы.

Важно отметить, что биохимический анализ везикул, полученных посредством градиентного центрифугирования ранее, подтверждал наличие только внешнемембранных и периплазматических компонентов и полностью отрицал факт присутствия белков цитоплазматической мембраны и цитоплазмы [58, 59]. Однако, позже стали появляться работы, убедительно доказывающие, что везикулы могут содержать белки цитоплазмы [60-62]. Предположительно, отбор данных белков определяется уникальным механизмом сортировки. Таким образом, везикулы вошли в категорию не только секреторного аппарата клетки, но и строго детерминированного механизма клеточной секреции, наравне с уже описанными до этого системами секреции 6-ти типов.

### 1.3 Факторы вирулентности и токсины, ассоциированные с везикулами

На сегодняшний день не существует единой теории формирования везикул. Считается, что в периплазматическом пространстве, в определенные моменты времени за счет накопления значительного количества белков повышается давление на внешнюю мембрану, что приводит к выпячиванию ее части с захватом белков периплазмы. Однако объяснить наличие в составе везикул белков

цитоплазмы пока не удалось. Кроме того, среди захваченных везикулой, в ходе формирования веществ могут определяться нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК)[63-65], факторы вирулентности, такие как адгезины, различные протеазы, сигнальные и определяющие чувство кворума молекулы, антигены Льюиса и другие [66]. Но наиболее интересны везикулы именно патогенных бактерий, так как они содержат токсины [25, 67-69]. На сегодняшний день, для значительного числа бактерий продемонстрировано явление включения токсинов в везикулы. Определено несколько вероятных механизмов захвата токсинов в состав везикул [70]. Полностью сформированные токсины могут поступать в периплазму и далее захватываются в везикулы, при этом далее токсины могут быть локализованы в полости или ассоциированы с её внутренней или наружной поверхностью. Токсины могут проходить через мембрану, а также свободно секретироваться во внешнее пространство, посредством специальных механизмов секреции, ассоциируясь с ЛПС бактериальной клетки [71, 72]. Однако, указанные способы доставки токсинов в везикулы еще не исследованы в должной степени. Тем не менее, работы в данной области активно ведутся и, на сегодняшний день, для некоторых токсинов уже определены варианты доставки их в везикулы. Среди описанных вариантов везикуло-ассоциированных токсинов известны следующие: шига-токсин *Shigella dysenteriae* серотип I; термолабильный экзотоксин (LT) энтеротоксигенной *Escherichia coli*; Cytolysin *E.coli* и другие, указанные в таблице 1 [28, 67, 71].

Для LT токсина, выделяемого энтеропатогенной *E.coli*, была показана его ассоциация с ЛПС мембраны везикулы. Значительная часть данного токсина может поступать в периплазму и далее захватываться в везикулу. Было продемонстрировано, что часть токсина выделяется посредством II типа бактериальной секреции и, оказавшись во внеклеточном пространстве, также ассоциируется с ЛПС везикулы [67]. При этом важным наблюдением стал тот факт, что для подобного взаимодействия подходит только определенная структура ЛПС. Основная часть ЛПС – 2кето-3деоксиоктонат, который, будучи в

фосфорилированном состоянии, не взаимодействует с токсином [73]. Однако в ходе его дефосфорилирования происходит ассоциация токсина и ЛПС везикулы, благодаря чему становится возможным осуществить доставку токсина до клеток-мишеней. Связанный с везикулами токсин, является полностью активным и проникает в эпителиальные клетки [74].

Для штаммов *E.coli*, производящих Шига токсин, была показана его ассоциация с везикулами, при этом полностью зрелая форма токсина была выявлена в составе везикулы [28]. Наличие шига токсина именно в составе везикул было определено в ходе эксперимента по обработке везикул протеазами. Важно, что токсин не терял своей целостности. Однако известно, что бактерия может производить две формы шига токсина, и если первая его форма упакована в везикулу, так как не поддается влиянию протеаз, то вторая форма ассоциирована с ЛПС поверхности везикулы, так как в ходе протеазной обработки деградирует бесследно [75].

Не менее известным примером, ассоциированного с везикулами токсина, является *VacA* – токсин, продуцируемый *Helicobacter pylori*. В эксперименте по обработке культуры клеток эпидермоидной карциномы гортани (Нер-2) везикулами *Helicobacter pylori*, в составе которых был обнаружен *VacA* токсин, наблюдали клеточную вакуолизацию [76]. Однако, степень токсичности свободного и везикуло-ассоциированного токсина до сих пор обсуждается [70]. Тем не менее, токсин содержащие везикулы были обнаружены в образцах биопсии эпителиальной ткани желудка пациентов, содержащих *Helicobacter pylori*. Биохимический состав выявленных в образцах ткани и бактериальной культуре везикул был схож [33]. Интересно, что в везикулы входила усеченная форма токсина *VacA*, не содержащая сигнальную последовательность для секреции посредством I типа бактериальной секреции. Однако при обработке везикулами, содержащими токсин, эпителиальных клеток желудка происходила активация цитохром С-независимого апоптоза [77]. В **таблице 1** представлен

перечень известных на сегодняшний день бактериальных токсинов, ассоциированных с везикулами.

**Таблица 1** Перечень токсинов, ассоциация с везикулами которых описана в литературе

Бактериальный вид	Ассоциированное заболевание	Факторы вирулентности	Активность	Ссылки на публикации
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Плевропневмония	Арх токсин Протеазы	Цитолитическая и гемолитическая активность Протеолитическая активность	Negrete-Abascal et al.(2000)
<i>Actinobacillus Action-mycetomcomitans</i>	Заболевание периодонта	Лейкотоксин, Липополисахарид, GroEL, Пептидогликан ассоциированный токсин	Пороформирующая Мембранолитическая активность Эндотоксин, Цитотоксин, Провоспалительная активность	Goulhen et al. (1998), Karched et al. (2008)? Kato et al. (2002)
<i>Bacteroides fragilis</i>	Воспаление кишки Колоректальный рак	Геммаглютинин, алкалиновая фосфотаза, эстераза липаза, кислая фосфотаза, фосфогидролаза, $\alpha$ - и $\beta$ -галактозидаза, $\alpha$ -глюкозидаза, глюкозаминидаза, $\beta$ -глюкокоронидаза	Гемолитическая активность Протеолитическая активность	Patrick et al. (1996)
<i>Bacteroides succinogenes</i>	Абсцесс и бактериемия	Целлюлаза, Ксенолаза	Арил- $\beta$ -глюкозидазная активность Арил- $\beta$ -ксилозидазная активность	Forsberg et al. (1981)
<i>Bordetella pertussis</i>	Кашель	Аденилат циклаза Гемолизин Геммаглютинин филаментов (ФНА) Токсин (Ptx)	Адгезия, агглютинация эритроцитов, ингибирование эукариотической аденилат циклазы, повышение уровня цАМФ	Hozbor et al. (1999)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Болезнь Лима	Белок внешней мембраны А и В (OspA, OspB) OspD Декорин связывающий белок А (DbpA)	Адгезия клеткам эукариот	Dorward et al. (1991) Shoberg and Thomas (2003)
<i>Brucella melitensis</i>	Бруцеллез	Белки внешней мембраны (Omp25, Omp31)	Не определена	Gamazo and Moriyon (1987)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Инфекции респираторного тракта у больных кистозным фиброзом	Негемолитическая фосфолипаза С (PLC-N) Липаза, протеаза (PSCP)	Липолитическая активность	Allan et al. (2003)
<i>Campilobacter jejuni</i>	Гастроэнтерит	Цитолетальный токсин (CDT)	Генотоксические эффекты	Lindmark et al. (2009)

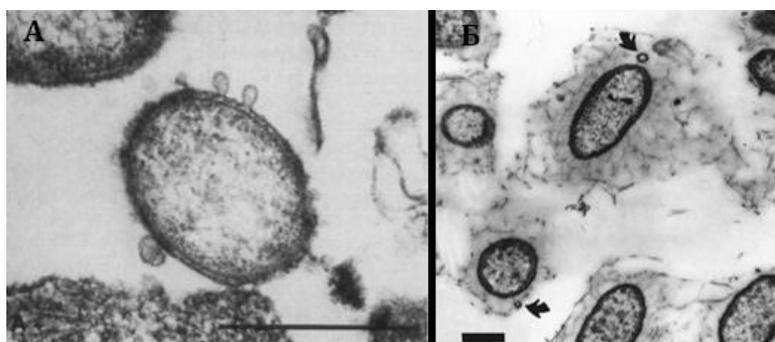
<i>Enterohemorrhagic E.Coli</i>	Кровавая диарея, колит	Цитолизин (ClyA) Шига-тоскин	Формирование пор в мембране, мембранолитическая активность Цитолитические эффекты, ингибирование синтеза белка	Kolling and Matthews (1999), Wai et al. (2003)
<i>Enterotoxigenic E.Coli</i>	Diarrhea	Энтеротоксин (LT)	Увеличение уровня аденилатциклазы, и цАМФ, потеря жидкости и электролитов	Horstman and Kuehn (2000)
<i>Extraintestinal pathogenic E.Coli</i>	Внекишечные инфекции: урогенетального тракта, неонатальный менингит, септицимия	А-гемолизин Цитолетальный токсин (CDT) Железо и гемм связывающие белки мембраны (OMPs)	Гемолитическая активность, генотоксический эффект, захват ионов железа,	Balsalobre et al. (2006)
<i>Shiga toxin producing E.Coli</i>	Геморрагический колит	Шига-тоскин	ингибирование синтеза белка	Kolling and Matthews (1999), Yokoyama et al. (2000)
<i>Uropathogenic E.coli</i>	Инфекции урогенетального тракта	Цитотоксин (CNF1)		Kouokam et al.(2006)
<i>Helicobacter pylori</i>	Язвенная болезнь желудка, рак желудка	Вакуолизирующий токсин (VacA) Уреаза, цистен-богатый белок (Hcp) Антиген Льюиса	Цитотоксичность, стимуляция пролиферации, секреция IL-8	Hynes et al. (2005) Keenan et al. (2000)
<i>Legionella pneumophila</i>	Болезнь легионеров	Активатор макрофагальной активности (Mir-1pg0791) Флагелин, внутриклеточный мультипликационный белок K и X (IcmK/IcmX) Фосфолипаза C Кислая фосфатаза, Дифосфогидролаза, хитиназа, протеаза, Hsp60	Ингибирование аутофагии в макрофагах, Инвазия и персистенция в эукариотических клетках, адгезия и инвазия в эпителиальные клетки, гликозилазная активность, интерференция с рядом функций иммунной системы,	Fernandez-Moreira et al. (2006), Galka et al. (2008)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Средний отит, синусит, ларингит	Поверхностный белок A1 и A2 (UspA1/UspA2)	связывание C3 компонента комплимента,	Tan et al. (2007)
<i>Mycococcus xanthus</i>	непатогенный	TonB транспортеры	Не установлена	Kahnt et al. (2010)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	гонорея	Порин B	Активация В-клеток	Zhu et al.(2005)
<i>Neisseria meningitidis</i>	менингит	PorA, PorB, NlpB, NarE,	Адгезия, липопротеин, токсин, АДФ-рибозилтрансферазная активность	Bjerre et al. (2000) Massignani et al.(2003) Schlichting et al.(1993) Vipond et

				al.(2006)
<i>Photorhabdus luminescens</i>	Патоген насекомых	Токсин АВ, GroEL	Инсектицидная активность, Цитотоксичность	Guo et al. (1999) Knandelwal and Banerjee-Bhatnagar (2003)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Заболевания периодонта	Arg- и Lys-цистеиновая протеиназа	Гемоглобиназная активность	Duncan et al. (2004) Grenier (1992) Grenier and Mayrand (1987) Kamaguchi et al. (2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Инфекции легких у пациентов с обструктивным заболеванием легких, фиброзом	Фосфолипаза С, гемолизин, щелочная фосфатаза, трансмембранный регулятор (CFTR), Фактор ингибирования (Cif), Муреин гидролаза, протеаза, $\beta$ -лактамаза	Гемолиз, Дегградация CFTR, бактерицидный эффект, лизис пептидогликана, IL-8 стимуляция	Bauman and Kuehn (2006), Ciofu et al. (2000), Cota-Gomez et al.(1997), Kadurugamuw a and Beveridge (1995), Li et al. (1998), MacEachran et al. (2007), Mashburn and Whiteley (2005), Bomberger et al. (2009)
<i>Salmonella typhi</i>	Брюшной тиф	Цитолизин ClyA OmpC	формирование поры, мембранолитическая активность,	Wai et al. (2003)
<i>Salmonella typhimurium</i>	диарея	Протективные антигены	Не определена	Bergman et al.(2005), Yoon et al. (2011),
<i>Shigella dysenteriae Serotype 1</i>	Шигеллез	Шига-токсин 1	токсичность	Dutta et al. (2004)
<i>Shigella flexneri</i>	Диарея	IpaB, IpaC, IpaD	инвазия	Kadurugamuw a and Beveridge (1998)
<i>Treponema denticola</i>	Заболевания периодонта	Дентилизин, адгезин, протеазы	Химотриптическая активность, адгезивная активность, разрушение межклеточного контакта	Chi et al. (2003), Rosen et al. (1995)
<i>Vibrio anguillarum</i>	Патоген рыб	Металлопротеазы Гемолизин, Фосфолипаза,	Протеазная, металлопротеазная, липолитическая активность	Hong et al. (2009)
<i>Vibrio cholerae</i>	Холера, диарея	RTX-токсин Холерный токсин (СТ)	Клеточное округление, деполимеризация актина, цАМФ активация, накопление жидкости	Bordman et al. (2007) Chatterjee and Chaudhuri (2011)

<i>Xanthomonas campestris</i>	Патоген растений	Целлюлаза, $\beta$ -глюкозидаза, белки системы секреции 3 типа, ксилозидаза,	Не определена	Sidhu et al.(2008)
<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	Патоген насекомых	Бактериоцин, адгезия, пороформирующий токсин, хитиназа	Адгезия, цитотоксичность, хитиназная активность	Knandelwal and Banerjee-Bhatnagar (2003)

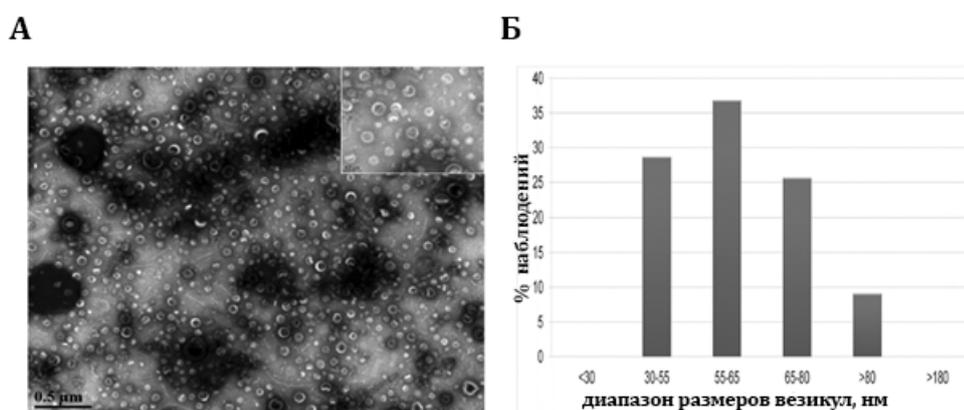
#### 1.4 Особенности везикулярного трафика у *B.fragilis*

До момента обнаружения везикул у *B.fragilis*, в культуральной среде отмечали значительную экстрацеллюлярную ферментативную активность [32]. Такие ферменты, как гиалуронидаза, хондроитин сульфатаза и липаза способствовали деградации компонентов клеток хозяина [78]. Кроме того, была отмечена связь между нейроменидазной активностью и способностью агглютинировать эритроциты [79]. Patrick и соавт. отмечали протеолитическую и гликозидазную активность везикул в отношении ряда субстратов. В своей работе авторы определили, что более чем 90% протеазной активности реализуется за пределами бактериальной клетки. Было высказано предположение, что все ферменты упакованы и поступают во внеклеточное пространство посредством везикул [32]. Также в ряде работ появляются убедительные снимки (**Рисунок 6**), выполненные посредством трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), демонстрирующие факт активной продукции *B.fragilis* везикул [3, 32].



**Рисунок 6** Ультратонкие срезы бактериальной культуры *B.fragilis* в момент продукции везикул. Масштабные отрезки для (А) -1 мкм, для (Б) – 500 нм. Стрелкой на рисунке (Б) отмечена сформированная везикула (Patrick и соавторы, 1995)

В работе авторы оценивают размеры везикул, определяя диаметр, который варьирует от 30 до 80 нм (**Рисунок 7**). Важно отметить тот факт, что для большинства грамотрицательных бактерий, с диаметром клеток от 1 до 1,5 мкм, были определены схожие размеры везикул, что позволяет утверждать наличие специфического механизма их формирования [26, 80-84].

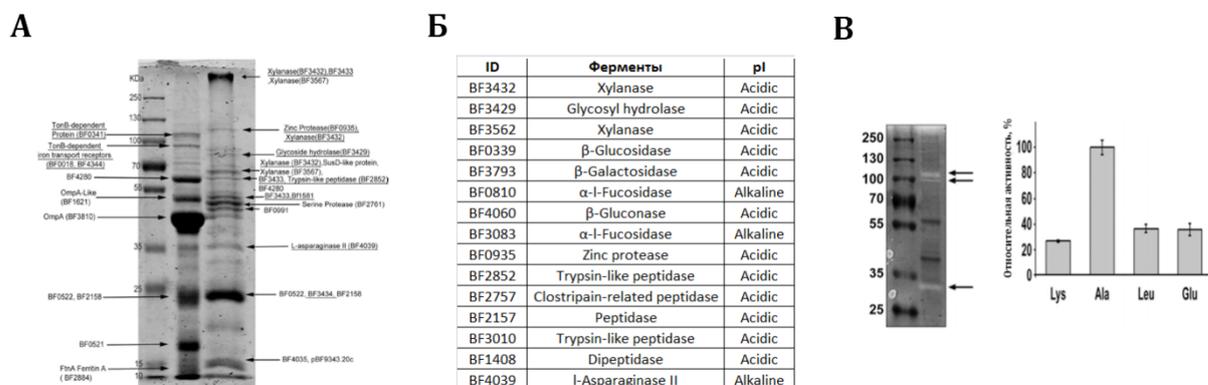


**Рисунок 7** Данные исследования препарата везикул посредством ТЭМ. (А) - препарат везикул *B.fragilis* в режиме негативного контрастирования. (Б)-столбчатая диаграмма, отражает процентное соотношение размеров везикул, определенных в ходе подсчета 1000 везикул в препарате.(Wael Elhenawy и соавторы, 2014)

Важным наблюдением стало обнаружение значительного количества ферментов в составе везикул грамотрицательных бактерий [85, 86]. Ферменты, выявленные в составе везикул *B.fragilis* по мнению авторов используются для гидролиза полисахаридов, расположенных на поверхности эпителиальных клеток [3]. Более того, для везикул *B.fragilis* также была отмечена способность к геммаглютинации эритроцитов. Результаты работы свидетельствовали о том, что геммаглютинирующая способность может быть обусловлена наличием полисахарида на поверхности везикулы, так как при инкубации везикул с периодатом в течение 30 мин происходит значительное снижение данной функции [32].

В ходе протеомного анализа везикул нетоксигенного штамма были выявлены конкретные классы ферментов: гидролазы, протеазы и липазы. Более того, активность ряда ферментов была протестирована с использованием

известных субстратов, что способствовало формированию гипотезы об использовании везикул для дистанционного ферментативного расщепления (Рисунок 8). Так, была продемонстрирована активность ферментов, локализующихся в везикулах в отношении желатина [3].



**Рисунок 8** Исследование протеомного состава и ферментативной активности везикул *B. fragilis*. (А) – Электрофореграмма тотального лизата внешней мембраны (2 дорожка после маркера) и везикул *B. fragilis* (3 дорожка после маркера); (Б) – ферменты, выявленные в ходе анализа везикул *B. fragilis* с указанием оптимальных условий их активности (pH); (В слева) – электрофореграмма, отражающая ферментативную активность везикул в отношении желатина. Стрелки указывают на отсутствие белков, подвергшихся протеолитическому расщеплению при обработке везикулами, содержащими протеазы; (В справа) – Определение относительной пептидазной активности везикул в отношении р-нитроанилид-связанных аминокислот (Wael Elhenawy и соавторы, 2014)

Кроме того, была протестирована протеазная активность везикул в отношении ряда пептидов, содержащих р-нитроанилид-связанные аминокислоты. После обработки везикулами субстратов, содержащих меченые аминокислоты, производили измерение оптической плотности свободного р-нитроанилида при 405 нм (Рисунок 8) [3].

### 1.5 Регуляция иммунного ответа посредством везикул *B. fragilis*

Уникальные свойства *B. fragilis* были неоднократно продемонстрированы в отношении целого ряда заболеваний. Так, удалось выявить активность бактерии в ходе снижения иммунного ответа при воспалительных заболеваниях кишечника, таких как колит и болезнь Крона, а также заболеваниях нервной системы, таких как рассеянный склероз. Эксперименты были проведены на животных моделях [87, 88]. Не менее удивительным фактом, стало описание механизма, благодаря

которому осуществляется подавление иммунного ответа, провоцирующего длительную воспалительную реакцию. Оказалось, что на поверхности везикул располагается полисахарид А (PSA) представляющий собой молекулу с иммуномодулирующим свойством. Механизм действия PSA сводится к следующему [89]. Везикулы после высвобождения взаимодействуют с поверхностно-расположенным Toll-подобным рецептором 2 (TLR2) дендритных клеток, что способствует секреции интерлейкина 10 (IL10). В свою очередь IL10 модулирует активность CD4 + FOXP3 + регуляторных Т-клеток (Tregs), которые подавляют воспаление. В ходе исследований по снижению воспалительной реакции при экспериментальном колите было показано, что везикулы, содержащие PSA, способствуют секреции фактора некроза опухоли, действующего на Т-хелперы 17 типа (Th17) [90]. Более того, дополнительные эксперименты позволили определить изменение уровня экспрессии ряда генов, способствующих формированию белков, таких, как Gadd45 $\alpha$ , необходимых для передачи PSA-опосредованных сигналов от TLR2 в дендритные клетки [53].

В одной из последних работ, посвященных изучению механизма активации Т-клеточного звена посредством PSA везикул *B.fragilis*, был показан уникальный иммуномодулирующий эффект. Болезнь Крона на сегодняшний день не имеет четкого описанного механизма патогенеза. Предполагается, что предрасположены к развитию болезни Крона могут быть лица, имеющие мутации в генах – регуляторах процесса аутофагии *Atg16L1*, *Atg5* и *Atg7* являющихся частью канонического и неканонического пути аутофагии. Интересно, что классические гены аутофагии *Ulk1*, *Fip200* or *Atg14* не требуются для активации CD4+Foxp3+IL-10+ Treg клеток посредством обработки везикулами [91].

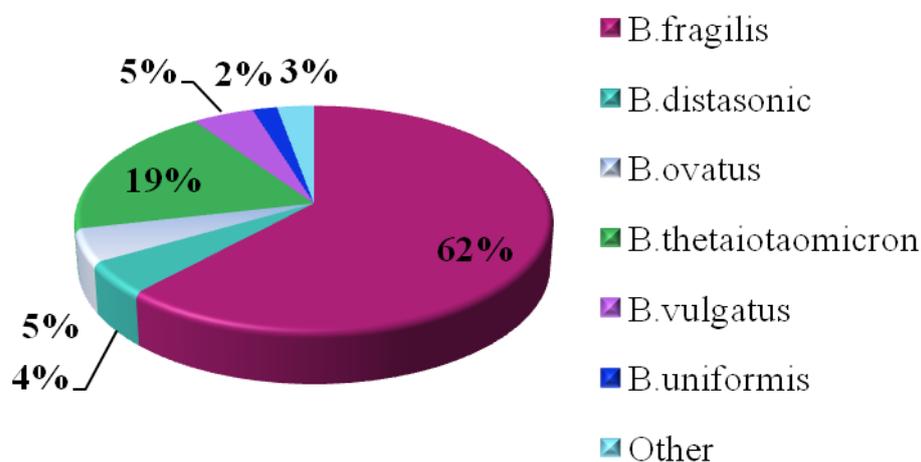
Кроме того, мутации в гене *NOD2* – бактериальном сенсоре для активации аутофагии, также могут способствовать развитию патологии. В своих экспериментах Hsiutung Chu и соавторы показали, что наличие мутаций в гене *NOD2* способствует снижению чувствительности к терапии посредством везикул, содержащих PSA [92]. Таким образом, авторы предположили дополнительную

роль генов, ранее вовлеченных в процесс защиты от патогенных бактерий, в привлечении полезных комменсалов, имеющих позитивное влияние на слизистую кишки [91].

### 1.6 *B. fragilis* – оппортунистический патоген

*B. fragilis* - как один из видов *Bacteroides* является не только симбионтом, участвующим в процессах естественной ферментации углеводов, белков и метаболизме желчных кислот, но и - оппортунистическим патогеном, ответственным за развитие анаэробных инфекций [2]. Интересно, что непатогенные штаммы *B. fragilis* (NTBF – nontoxigenic *B. fragilis*), как и токсигенные (ETBF – enterotoxigenic *B. fragilis*) могут являться частью микрофлоры ЖКТ.

Как отмечается в работе Wexler и соавторов, *B. fragilis* преобладает в образцах тканей больных анаэробными инфекциями (**Рисунок 9**) [2].

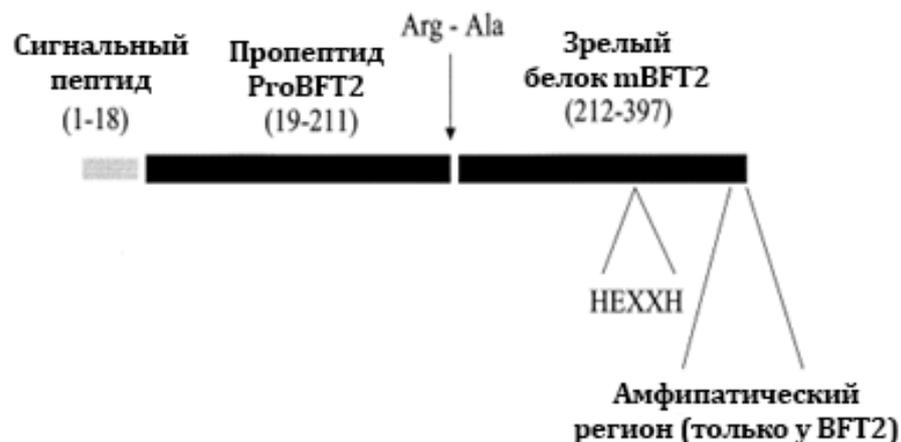


**Рисунок 9** Представленность различных видов рода *Bacteroides* в образцах, полученных от людей с анаэробными инфекциями (по данным Wadsworth Anaerobe Laboratory, США) (Wexler, 2007).

В 1984 впервые была продемонстрирована ассоциация ETBF с развитием диареи у ягнят [7]. Эти же исследователи показали, что, как сами бактерии, так и культуральная жидкость вызывает выделение воды в просвет перевязанных

петель кишечника ягнят [93, 94]. Было предположено, что эффект обводнения перевязанных петель кишечника связан с воздействием белкового токсина, секретируемого в культуральную жидкость. В 1992 г. Van Tassel R.L. с коллегами выделили из культуральной жидкости EBTF штамма VPI 13784 белок с массой 19 кДа (согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, SDS-PAGE) [8]. Изолированный белок проявлял схожую активность, что и культуральная жидкость ETBF. Выделенный токсин получил название фрагилизин, или BFT (*B. fragilis toxin*). Была определена N-концевая последовательность белка - Ala-Val-Pro-Ser-Glu-Pro-Lys-Thr-Val-Tyr-Val-Ile-Xxx-Leu-Arg-Glu-Asn-Gly-Ser-Thr [8]. Позже была определена полная последовательность, кодирующая BFT [10]. Кроме того, было показано наличие цинк-связывающего мотива HEXXHXXGXXH, характерного для металлопротеиназ [95]. Ген *bft*, кодирующий данный токсин вместе с геном другой металлопротеиназы – *mpII* – входит в состав островка патогенности длиной примерно 6 т.п.о. (VfPAI). Островок патогенности находится внутри конъюгативного транспозона [96].

В клетках *B. fragilis* BFT синтезируется в виде препробелка, содержащего сигнальный пептид Sec-транслоказы и пространственно организованный в два плотно контактирующих домена (pBFT) (**Рисунок 10**). В процессе созревания сигнальный пептид и N-концевой домен отщепляются. С-концевой домен является активной формой токсина (mBFT) [10]



**Рисунок 10** Схема строения молекулы BFT. В процессе ферментативного расщепления под действием цистеиновой протеазы (клострипейн) белок теряет пропептид. Масса незрелой формы (pBFT) около – 44 кДа, масса зрелого белка (mBFT2)- 21 кДа.

В дальнейшем было выявлено, что после обработки BFT эпителиальных клеток, способных к поляризации, происходит разрушение межклеточных контактов [97]. Поскольку было известно, что BFT вызывает более быстрое и значительное изменение морфологии клеток при нанесении его на базолатеральную мембрану, по сравнению с нанесением на апикальную, Wu S. с коллегами предположили, что субстратом для BFT может быть белок, расположенный на базолатеральной мембране. При помощи метода Вестерн-блот гибридизации авторы выявили, что при обработке клеток линии HT-29/C1 происходит расщепление E-кадгерина, но не окклюдина [97]. Таким образом, помимо изменения морфологии клеток, расщепление E-кадгерина служит еще одним признаком наличия в препарате BFT.

### 1.7 Протеолитическая активность фрагилизина

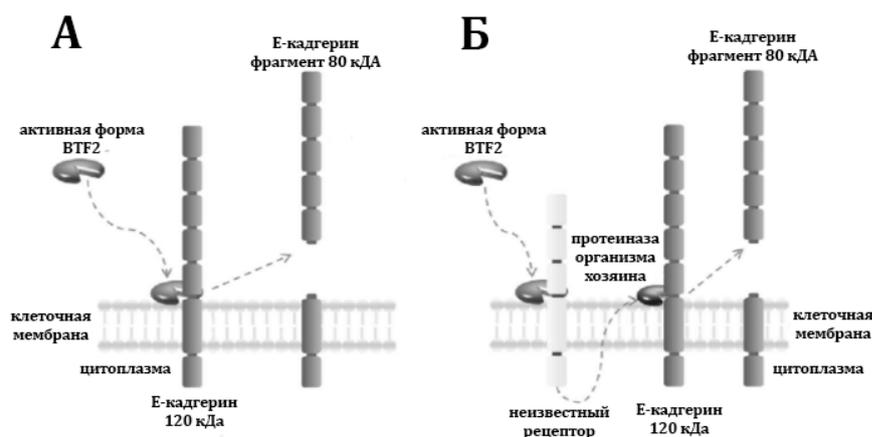
Кадгерины представляют собой семейство молекул клеточной адгезии. Они играют ключевую роль в регуляции морфогенеза [98, 99] участвуют в поляризации клеток и трансмембранном транспорте, выступают в роли опухолевых супрессоров [100-102]. Члены суперсемейства кадгеринов имеют свои характерные черты. У всех них присутствуют внеклеточный N-концевой участок, представленный повторяющимися доменами (так называемые

кадгериновые домены, ЕС) из примерно 110 аминокислотных остатков, один трансмембранный участок и С-концевой цитоплазматический участок.

В субконфлюэнтной культуре клеток HT29/C1, обработанной ВФТ, расщепление Е-кадгерина начинается в течение 1 мин и обычно завершается через 1-2 часа. Этот процесс происходит в два этапа: сначала высвобождается эктодомен Е-кадгерина, а затем происходит расщепление внутриклеточных фрагментов Е-кадгерина, с помощью пресенелин-1/ $\gamma$ -секретазы клетки хозяина [14]. Е-кадгерин связан с внутриклеточным доменом катенина - ядерным сигнальным белком, участвующим в процессах клеточного роста. Продемонстрировано, что  $\beta$ -катенин играет центральную роль в сигнальном пути Wnt/Wingless [103]. При разрушении Е-кадгерина увеличивается уровень несвязанного цитоплазматического  $\beta$ -катенина, что сопровождается его транслокацией в ядро. В ядре  $\beta$ -катенин формирует гетеродимеры с транскрипционными факторами семейства HMG-box LEF/TCF, что приводит к изменению экспрессии определенных генов, в том числе и *c-myc* [104]. Увеличение синтеза *C-myc* способствует пролиферации клеток HT29/C1 [104]. Также обработанные ВФТ клетки HT29/C1 обладают большей подвижностью по сравнению с необработанными. Эти данные согласуются с фактами, что снижение количества Е-кадгерина у опухолевых клеток повышает их метастатический потенциал. ВФТ-индуцированная пролиферация колоноцитов и их подвижность согласуются с предположениями об онкогенном потенциале ВФТ и связью между колонизацией кишечника ЕТВФ и колоректальным раком.

Однако стоит отметить, что согласно другой теории протеолитической активности ВФТ, токсин связывается с поверхностным рецептором, запуская каскад биохимических реакций, с опосредованным разрушением Кадгерина [105]. Данная версия, как и версия прямого воздействия токсина, является только одной из вероятных гипотез. При этом самым главным вопросом остается способ

секреции и доставки токсина, который на сегодняшний день не определен.



**Рисунок 11** Две гипотезы ферментативной активности BTF2. (А) – E-кадгерин является непосредственным субстратом протеолитической активности BTF2. (Б) - E-кадгерин разрушается в результате влияния неизвестной протеазы, моделируемой посредством предварительно активированного токсином (BTF2) рецептора.

## 1.8 Заключение

Везикулы являются универсальным способом бактериальной секреции, а также имеют важнейшее значение для тех бактерий, которые лишены известных способов секреции. *B.fragilis* относится к числу бактерий, не имеющих аннотированных способов бактериальной секреции. Однако везикулы, выделяемые *B.fragilis* имеют уникальные иммунопротективные свойства, связанные с наличием поверхностного антигена - PSA, в случае NTBF, и вероятную способность переноса факторов вирулентности и патогенности, посредством везикул у ETBF. Учитывая тот факт, что для значительного количества патогенных бактерий уже показана ассоциация токсинов с везикулами, а также то, что везикулы являются структурой с широким ассортиментом потенциально активных белков, в данной работе была проведена полная протеомная и метаболомная характеристика везикул. Также был проведен поиск потенциального механизма секреции и доставки токсина до клеток хозяина.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Бактериальные штаммы и клеточные культуры

В работе 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 были культивированы на чашках содержащих кровяной агар, 5% дефибринолизированную лошадиную сыворотку или на готовой жидкой среде содержащей мозговую и сердечную выжимку дополненную гемином (5 г/мл) (Columbia Broth Base, HIMEDIA, Индия). Культивация проводилась в анаэробных условиях с применением анаэроустатов на 3,5 л. (БиоВитрум, Санкт-Петербург), а также системы генерации атмосферы для анаэробов (Thermo Fischer Scientific, США).

В работе использована линия клеток HT-29 (линия клеток аденокарциномы толстого кишечника человека) (ATCC, номер HTB- 38, США). Клетки HT-29/C1 рассеивали в культуральные флаконы (25 см<sup>2</sup>) в среде DMEM (LifeTechnologies, США), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (Gibco, США), 2 мМ GlutaMax (LifeTechnologies, США), 50 мкг/мл гентамицина (LifeTechnologies, США) и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2 Антитела

Незрелая (pBFT2) и процессированная изоформа (mBFT2) рекомбинантного токсина, мутантные формы токсина (mut-pBFT2 и mut-mBFT2), а также поликлональные антитела против токсина (AT-BFT2) были любезно предоставлены лабораторией генной инженерии ФГБУ “ФНКЦ ФХМ” ФМБА России. Подробное описание процесса получения антител против фрагилизина представлено в работе Харлампиевой Д.Д. и соавторов [18]. Мутантные формы токсина (BFT2) получены путем сайт-направленного мутагенеза, где остатки

гистидина в активном центре были заменены тирозином (H348Y, H352Y и H358Y). Подробное описание получения мутантных форм токсина представлено в работе Харлампиевой Д.Д. и соавторов [18].

Для изучения деградации кадгерина в качестве первичных антител использовали коммерческие антитела IgG мыши к E-кадгерину (LifeTechnologies, США). В качестве вторичных антител использовали антитела овцы против иммуноглобулинов G мыши и антитела осла против иммуноглобулинов G кролика, меченные пероксидазой хрена (Amersham Biosciences, США) в разведении 1:10000.

### **2.3 Химические реагенты**

В работе использовали неорганические соли фирм Merck (Германия), Sigma (США) и реактивы квалификации х.ч. и о.с.ч. отечественного производства, а также белковые маркеры молекулярной массы Unstained Protein Molecular Weight Marker фирмы Life Technologies (США).

Для проведения экспериментов с применением обращено-фазовых липосом были использованы фосфатидилхолин (100 мг/мл) и фосфатидилэтаноламин (100 мг / мл) фирмы производителя - Sigma-Aldrich (США).

Для проведения метаболомного анализа были использованы следующие стандартные химические вещества: пируват натрия (100 мг / мл), D-фруктоза-6-фосфат, D-рибоза-5-фосфат, и ди-глицеральдегид-3-фосфат (46,1 мг/мл). Очищенные (98% чистоты) аминокислоты, нуклеотиды, нуклеозиды (аденозин, дезоксиаденозин, инозин, цитозин-монофосфат и тимидин) фирмы производителя - Sigma-Aldrich (США) были использованы в качестве стандартов. Следующие реагенты использовали для приготовления растворов: метанол (ВЭЖХ) Biosolve (Нидерланды), ацетат аммония (ультрачистый) Helicon (Россия), муравьиная кислота (98-100%) Riedel-de-Haen (Германия), раствор гидроксида аммония (29,73%) Fisher Scientific (США), вода (ВЭЖХ-МС) и ацетонитрил (ВЭЖХ-МС) Panreac (Испания).

## 2.4 Выделение везикул

Жидкая ночная культура *B.fragilis* была центрифугирована при  $4500 \times g$  при  $4^{\circ}\text{C}$ . Супернатант был отобран и дополнительно профильтрован через фильтр с размером пор  $0.45 \text{ мкм}$  (Millex GV; Millipore). Полученный после фильтрации супернатант был подвергнут ультрацентрифугированию при  $100000 \times g$  в течение 2 часов (Optima L-90K ultracentrifuge; Beckman Coulter). Полученный в ходе ультрацентрифугирования осадок ресуспендировали в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS) и дополнительно фильтровали через фильтры с поливинилиден-фторидной мембраной с диаметром поры  $0.22 \text{ мкм}$  (Millex GV; Millipore). Полученный фильтрат повторно ультрацентрифугировали. Осадок суспендировали в  $150 \text{ mM NaCl}$  (pH 6.5).

## 2.5 Электронная микроскопия препарата везикул и клеток

Клетки, полученные после осаждения центрифугированием суспензионной культуры *B.fragilis* обоих штаммов, а также везикулы ETBF и NTBF были подвергнуты микроскопическому исследованию методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Везикулы, ресуспендированные в PBS буфере ( $5 \text{ мкл}$ ) были негативно контрастированы с применением 2% уранил ацетата в течение 3 минут. Полученные препараты были оценены методом электронной микроскопии с использованием электронного микроскопа Zeiss Libra 120 (Zeiss, Germany) при увеличении от 10000 до 40000 раз. Ультратонкие срезы бактериальных клеток токсигенного и нетоксигенного штамма были изготовлены в лаборатории структурной организации генома в институте цитологии РАН г. Санкт-Петербург. Срезы бактериальных культур обоих штаммов были исследованы посредством электронного микроскопа Zeiss Libra 120 (Zeiss, Germany) при увеличении от 10000 до 40000 раз.

## 2.6 Фракционирование клеточного лизата

Клеточное фракционирование было выполнено согласно протоколу, изложенному в работе Lindmark и соавторов с небольшими модификациями [106].  $5 \text{ мл}$  жидкой культуры *B.fragilis* было центрифугировано при  $5000 \times g$  в течение

20 мин. Осадок бактериальных клеток был дважды отмыт в 0,2 мл 0.01 М Tris-HCl (pH 8.0) и 0.3 М NaCl и ресуспендирован в 0.2 мл 0.03 М Tris-HCl (pH 8.0), 20% сахарозе, и 0,1 мМ EDTA при 25°C. После 10 минут инкубации, клетки были собраны посредством центрифугирования при 5000 x g в течение 20 мин и аккуратно ресуспендированы в 0.3 мл ледяного 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>. После инкубации на льду в течении 10 минут, клетки были удалены путем центрифугирования при 12000 x g. Супернатант полученный после центрифугирования представлял собой периплазматическую фракцию и был использован для дальнейшего протеомного анализа. Клеточный осадок был ресуспендирован в 0.5 мл стерильной деионизованной воды и подвергнут деструкции под влиянием ультразвука в течение 5 минут. Клеточный дебрис и не разрушенные клетки были удалены центрифугированием при 5000 x g в течении 10 мин при 4°C, а результирующий супернатант был фракционирован на мембранную и цитоплазматическую фракции центрифугированием при 10000 x g в течении 30 минут при 4°C. Результирующий супернатант был определен, как цитоплазматическая фракция и отправлен на дальнейшее протеомное исследование. Осадок был ресуспендирован в стерильной деионизованной воде и был использован для протеомного исследования, как мембранная фракция. Экстракция белков из периплазматической, мембранной и цитоплазматической фракции была произведена с использованием ледяной трихлоруксусной кислоты (10% в объеме раствора). Преципитация белков была произведена посредством центрифугирования при 12000 x g. Полученные осадки были отмыты холодным ацетоном и высушены.

### **2.7 Геномное сравнение штаммов**

Имеющиеся в базе данных PubMed (Genomes) геномы двух анализируемых штаммов BOB25 (GenBank номер: CP011073) и JIM10 (GenBank номер: NZ\_MBRV000000000), сиквенирование которых был проведен в институте ФГБУ “ФНКЦ ФХМ ФМБА России”, были выровнены для качественного сравнения посредством программы “bowtie2” (версия 2.2.6, США) [107]. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) были оценены посредством

программного обеспечения “samtools mpileup” и “varscan” (Вашингтон, США) с вероятностью  $P \leq 0.05$  [108]. “R пакет” был использован для расчета плотности SNP в скользящем окне 10000 нуклеотидов. Модальное значение было использовано в качестве оценки частоты SNP на единицу генома. Для поиска уникальных генов было использовано программное обеспечение “bedtools” (версия 2.26.0).

## 2.8 Выделение белка и электрофорез

Полученные в результате фракционирования образцы мембранной, цитоплазменной и периплазменной фракции, а также выделенные препараты везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов *B.fragilis* были солюбилизованы в растворе Лэмли, содержащего CHAPS с последующей инкубацией при 95°C в течение 5 минут. Аликвота каждого образца была использована для измерения концентрации белка по методу Брэдфорда с использованием реагента Quick Start Bradford 1x Dye Reagent (BioRad, США) согласно протоколу производителя. В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США). 40-60 мкг белка трех клеточных фракций и по 40 мкг белка везикул обоих штаммов было нанесено на полиакриламидный гель (ПААГ) (10x10x0.1 см) с последующим разделением при 18В/см<sup>2</sup>. После завершения электрофореза белков, гели были помещены в раствор Кумасси G-250 для фиксации белков. Гели визуализировали путем отмывания в 10% уксусной кислоте.

## 2.9 Протеомное исследование везикул методом ВЭЖХ-МС/МС

### 2.9.1 Пробоподготовка

Гель, после проведения электрофореза образцов фракционированного лизата и везикул обоих штаммов, был разделен на фрагменты (1 × 1 мм) и перенесен в пробирки. Восстановление дисульфидных связей было выполнено при добавлении 10 мМ DTT (в 100 мМ аммоний бикарбонатном буфере) при 50°C в течение 30 мин. После было проведено алкилирование белков при добавлении 55 мМ йодацетамида (в 100 мМ аммоний бикарбонатном буфере) при комнатной

температуре, в течение 20 мин, в темноте. После алкилирования к фрагментам геля был добавлен 50 % ацетонитрил (в 50 мМ аммоний бикарбонатном буфере), с последующей полной дегидратацией при добавлении 100% ацетонитрила. После удаления 100% ацетонитрила, к образцам был добавлен модифицированный трипсин 13 нг/мкл (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, США) (в 50 мМ аммоний бикарбонатном буфере). Пробы инкубировали 16 часов при 37° С. Триптические пептиды были экстрагированы из геля добавлением 2-х объемов 0,5% трифторуксусной кислоты, с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 1 часа, а также двумя объемами 50% ацетонитрила, также с инкубацией в течение 1 часа. Объединенный пептидный экстракт был высушен на вакуумном испарителе и растворен в 3% растворе ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой.

### **2.9.2 Параметры измерения для протеомного анализа везикул**

Хромато-масс-спектрометрический анализ полученных образцов пептидов проводился на масс-спектрометре TripleTOF 5600+ (ABSciex, Канада), сопряженным с нано-ВЭЖХ системой NanoLC Ultra 2D+ (Eksigent, США) через источник ионов NanoSpray III (ABSciex, Канада), а также посредством системы Ultimate-3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific, США) совмещенной с maXis qTOF после HDC-cell upgrade (Bruker) с наноэлектроспреем. Параметры хроматографического разделения, используемые колонки, а также параметры работы масс-спектрометра подробно указаны в работе Захаржевской Н.Б. и соавторов [31].

### **2.9.3 Идентификация белков и пептидов**

Для идентификации белков была создана база поиска по геномам ETBF и NTBF. Аннотированные белки были загружены в базу в формате Fasta. (RefSeq: NZ\_CP011073.1, 4127 аминокислотные последовательности). Геномы были загружены из базы данных NCBI в формате Fasta(NZ\_CP011073.1). Открытые рамки считывания были экспортированы согласно программному обеспечению

Artemis версии 16.0.0 с опцией “Mark Open Reading Frames”. Минимальная длина рамки считывания – 40 аминокислот. Первичные данные формата WIFF и D были конвертированы в формат Mascot generic (MGF) используя программное обеспечение AB SCIEX MS Data Converter версии 1.3 и Compass Data Analysis 4.2 (Build 383.1). Идентификация белков была проведена посредством программного обеспечения Mascot Search Engine версии 2.5.1. Была использована стратегия поиска для расчета FDR. Пороговое значение было рассчитано с использованием программного обеспечения Mascot. При наличии высокого оценочного балла заданного программой для отдельного пептида по отношению к оценочному баллу белка, идентификация белка считалась успешной, указывая на высокую идентичность или гомологичность со значением вероятности  $p < 0,05$  и  $FDR < 5\%$ . Пептид считался идентифицированным, если его ранг был 1 и оценка выше, чем порог идентификации установленный программой для данного белка. Белок считался идентифицированным, если определялось не менее 2 и более идентифицированных уникальных пептидов.

## **2.10 Протеоеномный анализ**

Протеоеномный анализ был реализован посредством программных пакетов Genome Search Specific Peptides (GSSPs) и Protein database (ProtDB). Реаннотация колирующих областей, открытых рамок считывания и псевдогенов была проведена с использованием программного обеспечения Prokka tool [109].

## **2.11 Метаболомный анализ с использованием ВЭЖХ-МС/МС метода**

### **2.11.1 Пробоподготовка**

Для метаболомного анализа, везикулы обоих штаммов выделяли из 250 мл культур ETBF и NTBF, выращенных в жидкой среде до середины логарифмической фазы. Везикулы отмывали в 150 мМ NaCl, и собирали путем центрифугирования при 100000g при температуре 4 °C в течение 1 часа. Осадок везикул ресуспендировали в 5 мл 150 мМ NaCl и снова осаждали с помощью ультрацентрифугирования при 100000 x g при температуре 4°C в течение 1 часа. Полученный осадок везикул ресуспендировали в 100 мкл 150 мМ NaCl.

Метаболическую активность везикул быстро останавливали холодным метанолом. Метаболиты экстрагировали добавлением 900 мкл метанола (-20 °C) к 100 мкл ресуспендированных в 150 mM NaCl везикул. 10 мкл изотопно-меченной L-глутаминовой кислоты- $^{13}\text{C}_5$  (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), 1 мг / мл добавляли в качестве внутреннего стандарта. Образец энергично встряхивали (1 мин), а затем выдерживали при -77 ° C в течение 15 мин. Образец нагревали до комнатной температуры в течение 3 мин, а затем тщательно встряхивали снова. Полученный образец центрифугировали в течение 30 мин при 16000g при 4 °C. Супернатант подвергали вакуумной сушке с использованием SpeedVac концентратора (Thermo Fisher Scientific, США). Сухой экстракт выдерживали не дольше, чем 10 дней до анализа. Сухой экстракт растворяли в 100 мкл смеси, состоящей из 20% ацетонитрила и 80% воды.

### **2.11.2 Параметры детекции метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС**

Метаболомный анализ был выполнен с использованием ВЭЖХ-МС системы LCMS-8030 на основе тройного квадрупольного масс-спектрометра (Shimadzu, Kyoto, Japan). Ионизация веществ осуществлялась с использованием электроспрейного источника ионизации. Напряжение на электродах в положительных и отрицательных режимах ионизации составило 4500 В. В качестве осушающего, распыляющего газа и газа в ячейке соударений использовали азот различной степени чистоты с потоком 3 л / мин. Температура капилляра составляла 250 °C. Температура нагревательного блока составляла 400 °C. Масс-спектрометрический анализ метаболитов проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) со следующими параметрами в режиме положительном ионизации: 5 временных сегментов, время накопления ионов в каждой транзиции - 10 мс, максимальное время цикла - 2.245 с. В режиме отрицательной ионизации было оценено 11 временных сегментов: время накопления ионов – 10мс, максимальное время цикла - 2.455 с. Временные сегменты анализа MRM, энергии столкновения и времени удерживания различных метаболитов были выбраны на основании ВЭЖХ-МС / МС-анализа

химических стандартов. Разделение метаболитов проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (Shimadzu, Kyoto, Japan). Для хроматографического анализа использовали колонку: Zorbax RX-SIL Narrow-Bore (150 мм×2.1 мм×5 мкм), снабженную защитной колонкой Zorbax RX-SIL 4-Pack (4,6 мм × 12,5 мм × 5 мкм) компания Agilent Technologies. Хроматографический анализ проводили со следующими параметрами: температура автосемплера составила 20 °С; температура колоночного термостата 32 °С; объем закола образца - 10 мкл; Скорость потока растворителя - 500 мкл / мин. Следующие растворители использовали в качестве элюирующих растворов: элюент А - 20 мМ ацетата аммония / 0,25 мМ гидроксида аммония в смеси вода / ацетонитрил (95:5), рН 8,00; элюент В - чистый ацетонитрил. Градиент перехода растворителя: для положительного и отрицательного режима ионизации Т = 0 мин, 100% В; Т = 15 мин, 0% В; Т = 18 мин, 0% В; Т = 19 мин, 100% В; Т = 32 мин, 100% В.

### **2.11.3 Интерпретация результатов**

Исходные данные масс-спектрометрического анализа метаболитов обрабатывали с использованием программы "LabSolutions LCMS" Version 5.75 (Shimadzu Corporation, Киото, Япония) Метаболиты были проанализированы в режиме мониторинга множественных реакций реакции (MRM).

### **2.11.4 Статистическая обработка результатов метаболомного анализа**

Количественный анализ отличий содержания метаболитов в двух группах образцов был произведен с использованием парного t-теста Стьюдента на уровне значимости ( $p \leq 0,05$ ). Для учета возможных ошибок множественного сравнения (FDR) использовали поправку Бенджамина-Хехберга. Отсечка значение для FDR ( $Q < 0,2$ ) была применена в соответствии с предыдущими исследованиями [110, 111]. Для интерпретации результатов были использованы следующие программы пакеты: UniCrom (Новые аналитические системы (Беларуссия)), AMDIS (<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/downloads/>) и NIST8, Wiley<sup>9</sup> и Golm (HTTP: // [gmd.mpimp-golm.mpg.de](http://gmd.mpimp-golm.mpg.de)). Полученные данные масс-

спектрометрии были помещены в UCSD (Центр вычислительной масс-спектрометрии) (Massive ID: MSV000080304).

## **2.12 Метабономика ГХ-МС**

### **2.12.1 Пробоподготовка**

Метаболиты везикул обоих штаммов выделяли согласно протоколу описанному ранее в главе 2.11.1. Полученный осадок растворяли в 20 мкл пиридина и конвертировали в триметилсилил производные путем добавления 20 мкл N, O-бис (триметилсилил) трифторацетамида (БСТФА), содержащего 1% триметилхлорсилана (ТМС). Химическую реакцию осуществляли при нагревании до 100 °С в течение 15 мин. 0,5 мкл этой реакционной смеси вводили в газовый хроматограф.

### **2.12.2 Параметры детекции метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС**

Для ГХ-МС анализа силилированных образцов использовали газовый хроматограф HP 6850, сопряженный с HP 5975С масс-селективным детектором (MSD) на квадрупольной основе. Для капиллярной колонки НВ5-МС (30 м x 0,25 мм I.D. толщиной пленки 0.25 мкм) был использован гелий в качестве газ-носителя при постоянной скорости потока 1 мл / мин. Температура инжектора и источника МС поддерживалась на уровне 320 °С и 230 °С, соответственно. Программа температуры колонки включала инъекцию при 70 °С с увеличением на 6 °С / мин до 320 °С, за которыми следует изотермическая выдержка при 320 °С в течение 15 мин. Трикосан (10 мкг) использовали в качестве внутреннего стандарта для количественного определения аналитических результатов. Образцы были проанализированы в режиме разделения (split ratio: 1/20). МС работал в режиме электронного удара с энергией ионизации 70 эВ. Диапазон масс сканирования составил от 50 до 1000 Да при 1,27 сканов / сек.

### **2.12.3 Интерпретация результатов**

Данные были обработаны и подсчитаны с использованием программного обеспечения AMDIS (<http://chemdata.nist.gov/massspc/amdis/downloads/~~HEAD=po bj>). Идентификацию соединений проводили путем сравнения с

хроматографическими характеристиками удерживания и масс-спектров аутентичных стандартов ГХ-МС системы данных (8 NIST 2010).

### **2.13 Реконструкция метаболических карт везикул**

Реконструкция карт метаболической активности была проведена на основании данных протеомного анализа, протеогеномного анализа с определением псевдогенов и возможных кодируемых ими ферментов, а также данных метаболомного анализа. Для построения метаболических карт в соответствии с аннотированными ферментами для каждого вида была использована информация из следующих баз данных: UniprotKB, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KeGG). Программа для визуальной реконструкции метаболической активности была разработана Фисуновым Г.Ю. (заведующим лабораторией протеомного анализа ФГБУ “ФНКЦ ФХМ” ФМБА России)

### **2.14 Анализ активности биохимических реакций с применением изотопномеченого метаболита**

Растворы, содержащие изолированные везикулы токсигенного и нетоксигенного штаммов, были разделены на три равные части. 1 мкг изотопномеченной D-глюкозы- $^{13}\text{C}_6$  был добавлен в предварительно подготовленные растворы, содержащие везикулы. Полученный раствор, содержащий меченый метаболит был инкубирован при 37 °C в течение 30 мин, 1 и 3 ч. 1 мкг изотопномеченного глутамата также был добавлен к образцу везикул в качестве отрицательного контроля. После инкубации все препараты, содержащие везикулы были подвергнуты ультрацентрифугированию при 100000 x g в течение 2 ч (Optima L-90K Ультрацентрифуга; Beckman Coulter). Супернатант удаляли, а осадок растворяли в 150 мМ NaCl. Готовый раствор использовали для экстракции метаболитов, как описано ранее в разделе "ВЭЖХ-МС/МС Пробоподготовка".

## **2.15 Определение локализации токсина**

### **2.15.1 Вестерн-блот гибридизация**

Выделенные везикулы и различные клеточные экстракты смешивали с Лэмли буфером, содержащем CHAPS в соотношении (1:1) и инкубировали при 95 °С. 40 мкг белка, выделенного из образцов везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов, а также 40-60 мкг периплазмической, цитоплазматической и мембранной фракции подвергали электрофоретическому разделению с использованием ПААГ, содержащего SDS с последующим вестерн-блот анализом. После проведения электрофореза проводили полусухой перенос белков на PVDF мембрану (Amersham Biosciences, США) при 1мА на см<sup>2</sup> геля в течение 2-х часов. Мембрану инкубировали в 1х PBS с 5% молоком (BioRad, USA) 30 мин и далее в течение ночи при 4°С с первичными антителами (prBFT2-His), разведенными в 1х PBS с 5% молоком (1:1000). Отмывали мембрану 3 раза по 10 мин в однократном фосфатно-солевом буфере (PBS). Инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с вторичными антителами. В качестве вторичных антител использовали антитела осла против иммуноглобулинов G кролика, меченные пероксидазой хрена (Amersham Biosciences, США) в разведении 1:50000. Отмывали мембрану 3 раза по 10 мин в однократном PBS. Проявляли с использованием набора ECL Plus (Amersham Biosciences, США) согласно инструкции производителя. Сигнал детектировали в системе геледокументирования ChemiDoc MP (Biorad, США).

### **2.15.2 Электронная микроскопия с применением антител против токсина, меченых золотом**

Для определения локализации токсина в препаратах клеток и везикул, образцы фиксировали формальдегидом и глутаровым альдегидом до конечной концентрации 4 и 0,1-0,2%, соответственно. Далее проводили обезвоживание этанолом в возрастающих концентрациях (70-96%) с последующей заливкой образцов в LR-белую смолу (Polyscience, INC, США). Для визуализации распределения токсина в препаратах клеток или везикул

использовали BFT2-специфические антитела, разбавленные в соотношении 1:50 в PBS (1 ×) и конъюгаты белка А с 15 нм коллоидными частицами золота (Aurion, TheNetherlands). Для негативного контрастирования везикулы сорбировали на покрытых углеродом никелевых сетках в течение 2 мин, выдерживали с антителами против BFT2, а затем негативно контрастировали с применением уранил ацетата. Меченные образцы исследовали с использованием электронного микроскопа Zeiss Libra 120 (Zeiss, Германия) при увеличении от 10000 до 40000 раз.

## **2.16 Липидное исследование мембраны и ЛПС**

### **2.16.1 Липидная экстракция**

Для экстракции липидов использовали 1 мл жидкой культуры (ETBF и NTBF). Образцы инкубировали при -77 °С в течение 15 мин, затем при комнатной температуре в течение 3 мин и центрифугировали при 10000g в течение 20 мин. Полученные осадки клеток использовали для экстракции липидов с помощью модифицированного протокола Фолча[112]. LPS был выделен с помощью метода Tri-Реагент, описанный Yi и Hackett [113].

### **2.16.2 Исследование компонентов мембраны методом прямого ввода образца**

Детекцию экстрагированных мембранных липидов и ЛПС проводили с использованием времяпролетного тандемного квадрупольного масс-спектрометра (Q-TOF Maxis, Bruker Daltonics, Германия) посредством прямого ввода образца.

Идентификация метаболитов основывалась на обнаружении фрагментов родительских ионов и сопоставлении их со спектрами стандартных веществ фосфолипидов (холин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, фосфатидная кислота и тетрациклин; Sigma Aldrich). Для идентификации липидов использовали следующие базы данных: MAPS (липидный MAPS Lipidomics, ресурс при поддержке Национального института медицинских наук, США;

<http://www.lipidmaps.org>), Byrdwell G. (<http://www.byrdwell.com>), METLIN (Скрипс Центр масс-спектрометрия, США; <https://masspec.scripps.edu>) и Галактозилцерамиды и Гликазилцерамиды (Цереброзиды) ([HTTP: // www.lipidhome.co.uk /](http://www.lipidhome.co.uk/)).

## 2.17 Компьютерное моделирование взаимодействия токсина со структурами везикул

Координаты атомов для создания трехмерной модели токсина (BFT2) были взяты из базы данных белковых структур (Protein data base) на основе структуры его гомолога BFT3 (PDB: 3p24 <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3p24>) путем замены нескольких аминокислотных остатков: Asn102 → Ser102, Tyr169 → Asp169, Pro170 → Leu170, Val177 → Leu177, Asn228 → Ser228, Tyr257 → Phe257, Ala270 → Ser270, Asn320 → Asp320, Asn357 → Arg357 и Asp383 → Tyr383. 3D-модели мишеней (фосфатидилэтаноламина (ПЭ), фосфатидилхолина (ПХ), липида А и полисахаридной цепи ЛПС) были созданы с Molsoft ICM версии 3.8-3. Докинг был проведен в два этапа. На первом этапе, сайты связывания мишеней определялись для фиксированной мишени (токсина). Комплексы, полученные на первом этапе докинга, были дополнительно уточнены за счет оптимизации конформации боковых цепей аминокислот, расположенных в радиусе 4 Å от лиганда с применением процедуры ВРМС. На втором этапе полученные в ходе процедуры докинга комплексы были отсортированы по энергии, и 100 лучших конформаций были отобраны для уточнения энергий связывания. Энергия связывания ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) оценивалась, как разность между значениями свободной энергией растворенного комплекса и суммы значений свободных энергий растворенных несвязанных мишени и лигандов (ПЭ, ПХ, липид А, Полисахарид). Также была произведена оценка вкладов энергии Ван-дер-Ваальса и водородных связей. Таким образом, энергия связи вычислялась по следующей формуле:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{el}} + \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{nonpolar}} - T\Delta S$$

Где  $\Delta G_{\text{bind}}$  – Энергия связывания

$\Delta G_{\text{el}}$  – энергия электростатического взаимодействия

$\Delta G_{\text{polar}}$  – сумма вкладов энергий полярных компонентов

$\Delta G_{\text{nonpolar}}$  – сумма вкладов энергий неполярных компонентов

$T\Delta S$  - энтропия

Величина энергии сольватации рассчитывалась согласно методу, предложенному Wesson и Айзенберг, для конформации комплексов, как сумма вкладов  $\Delta G_{\text{polar}}$  полярного компонента (энергия десольватации частичных зарядов, переносимых из водной среды в полость связывания рецептора) и неполярного компонента  $\Delta G_{\text{nonpolar}}$  (включая энергию Ван-дер-Ваальса и величину энергии, необходимой для формирования полости, равной объему растворенного вещества в растворителе). Кулоновское взаимодействие и  $\Delta G_{\text{polar}}$  были вычислены путем решения уравнения Пуассона по методу REBEL[114]. В соответствии с рекомендациями разработчиков ICM, диэлектрические постоянные мишени, лиганда и комплексов были взяты согласно условию формирования комплексов в воде- 78,5. Был произведен расчет гидрофобного ( $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ ) и энтропийного компонента ( $T\Delta S$ ), как суммы конформационной энтропии лиганда и мишени [115]. Конформационная энтропия лиганда вычислялась как  $RT\ln^*(Ns)$ , где  $Ns$  число низкоэнергетических конформационных состояний, полученных в ходе моделирования методом Монте-Карло. Потеря конфигурационной энтропии мишеней при связывании лигандов была рассчитана с использованием максимально возможной энтропии согласно данным библиотек для остатков боковых цепей аминокислот, участвующих в связывании с лигандами.

## **2.18 Физико-химические методы для оценки природы ассоциации токсина и структур везикулы**

### **2.18.1 Ядерно-магнитный резонанс**

Для ЯМР-спектроскопии 500 мкг mBFT2, 500 мкг фосфатидилхолина (ФХ) (Sigma Aldrich, США)) добавляли к 100 мкл  $D_2O$  в фосфатном буфере (pH 7.4). Все спектры были получены на Bruker Avance III 500 МГц ЯМР-спектрометре

(Bruker, США), снабженном Prodigy TCI криогенным трехканальным зондом. Температуру образца выдерживали при 300 К. Для исследования образования комплекса белок-липид были сняты 2D DOSY и общие 1D спектры протонов [116, 117]. Пик воды во всех опытах был подавлен последовательностью импульсов WATERGATE с пятью парами симметричных градиентов (задержка 125 мс для биномиального подавления воды и 200 мс задержки для восстановления градиента). Обработка и анализ данных ЯМР были проведены с использованием Bruker ЯМР TopSpin v.3.2.

### 2.18.2 Флюоресцентное тушение белка

Флуоресценцию остатков Trp и Tyr измеряли после добавления различных количеств липосом, полученных из ФХ и ФЭ и 3 нМ pBFT2, mBFT2, pBFT-Mut, mBFT-Mut, протеиназы-К или бычьего сывороточного альбумина (БСА) в стандартном PBS (Merck) или буфере с низкой ионной силой (1 нМ ZnSO<sub>4</sub> в соотношении 1:50 разведенный в PBS). Каждый раствор белка осторожно перемешивали после добавления липосом и хранили при комнатной температуре в течение 1-2 мин до измерения. Спектры флуоресцентной эмиссии регистрировались при температуре 20 °С с использованием Chirascan спектрометра (Applied Photophysics), снабженного термостатическим держателем кювет с щелями 4 и 6 нм при возбуждении в 280 или 295 нм. Световое рассеяние липосом было учтено при расчетах. Расчет коэффициента производился согласно уравнению (1)

$$Y = \frac{Y_{\max} \times X^n}{X^n + K_d^n} \quad (1),$$

где Y коэффициент флюоресцентного тушения и n коэффициент Хилла (n = 1±0.3 если не указано иное значение).

Обработка результата была произведена посредством программного пакета DataFit 9.

## **2.19 Биологические методы для оценки природы взаимодействия токсина и везикулы**

### **2.19.1 Флюоресцентная микроскопия**

Для визуальной оценки белково-липидных комплексов (mBFT2 / pBFT2-липосом) и везикул, фиксированных на поверхности клеток, использовали метод флуоресцентной микроскопии. Изолированные везикулы обоих штаммов (в пересчете на белок - 40 мкг каждого образца везикул) и 50 мкл подготовленных липосом (100 мг / мл) инкубировали с флуоресцентным красителем Vybrant DiI в течение 30 мин. Далее все препараты несколько раз отмывали посредством растворения в PBS и ультрацентрифугирования при 100000g в течение 1 часа. Дополнительно готовили препараты липосом с включением mBFT2 и pBFT2 или отдельной добавкой разных форм токсина к липосомам. Все приготовленные препараты инкубировали с культурой HT-29 в течение 1 часа. Затем клетки промывали 3 раза, инкубировали с DAPI для мечения ядер и наблюдали с помощью микроскопа Nikon Eclipse E800 (Nikon, Япония) и системы обработки изображений Olympus Cell Live (Olympus IX51, Япония) при увеличении в 100 раз.

### **2.19.2 Эксперименты по протеолитическому расщеплению E-кадгерина посредством везикул**

Для исследования биологической активности BFT2-содержащих везикул проводили их совместную инкубацию с культурой HT-29 в течение 2-х часов (везикулы были добавлены из расчета 40-60 мкг общего белка, выделенных из ETBF и NTBF на 3 млн. клеток). После инкубации, клетки промывали 1x PBS несколько раз и инкубировали с 50 мкл 1x буфера Лэмли, содержащего CHAPS. Для оценки степени расщепления E-кадгерина проводили вестерн-блот анализ с использованием моноклональных антител мыши против E-кадгерина (разведение 1: 1000, Invitrogen, США) и IgG с пероксидазой хрена (от овец, разведение 1: 10000, GE Healthcare, США). Способ проявки и детекции результата описан в главе “вестерн блот гибридизация”.

## **2.19.3 Эксперименты по протеолитическому расщеплению E-кадгерина с применением модели искусственных липосом**

### **2.19.3.1 Приготовление липосом**

Для получения липосом применяли метод обращено-фазового испарения. Для этого в круглодонной колбе смешивали 30 мкл ФХ или ФЭ в растворе хлороформа (100 мг / мл), 300 мкл PBS и 1 мл диэтилового эфира. Растворитель удаляли при пониженном давлении на роторном испарителе. Подготовленные липосомы растворяли в 200 мкл PBS. Для получения инкапсулированного в липосомы препарата токсина, 14.2 нМ mBFT2 или 12 нМ pBFT2 добавляли к раствору, содержащему 30 мкл ФХ или ФЭ в растворе хлороформа (100 мг / мл), 300 мкл PBS и 1 мл диэтилового эфира. Растворитель удаляли при пониженном давлении на роторном испарителе. Протеолитическую деградацию невключенного белка проводили посредством протеиназы-K (20 нг/ мкл). Инкапсуляцию токсина подтверждали с помощью вестерн-блот анализа с применением BFT2-специфичных антител. Для получения препарата токсина не включенного в липосомы, к 30 мкл предварительно приготовленных липосом добавляли 14.2 нМ mBFT2 и 12 нМ pBFT2. После добавления токсина проводили инкубацию в течение 30 минут, после чего осаждали липосомы методом ультрацентрифугирования при 100000g в течение 1 ч. Количество несвязанных mBFT2 в среде определяли с помощью Вестерн-блота.

### **2.19.3.2 Инкубация липосом с культурой клеток HT-29**

Оба типа липосом (с добавленным из вне и инкапсулированным токсином) инкубировали с культурой клеток HT-29 в течение 1 часа независимо. После инкубации клетки промывали несколько раз 1x PBS и смешивали с 50 мкл однократного раствора Лэмли, содержащего 1% CHAPS. Для детекции расщепления E-кадгерина, проводили вестерн-блот анализ с применением антител специфичных к E-кадгерину.

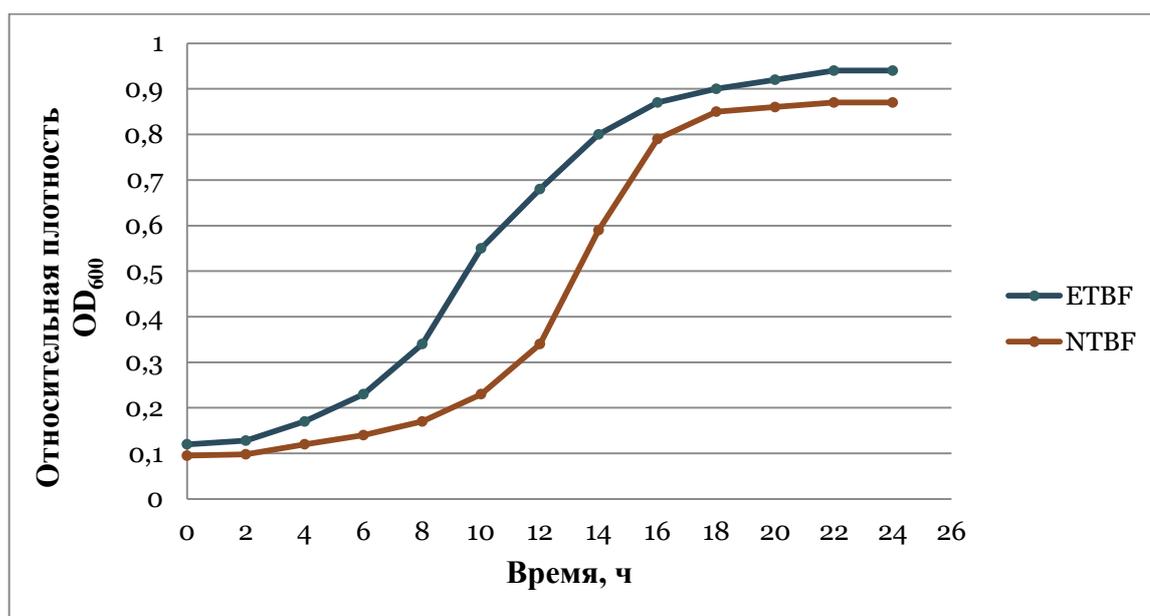
#### 2.19.4 Геммаглютинация

Исследование геммаглютинирующей способности везикул проводили с использованием красных кровяных клеток (эритроцитов), полученных от здорового донора (человек). Кровь была предоставлена добровольцем, группа крови была определена (Lewis O $\alpha$ - $\beta$  +). Письменное информированное согласие от участника было получено и одобрено этическим комитетом Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия (номер официального утверждения 1a / 2016). Эритроциты трижды отмывали центрифугированием при 200xg и повторно суспендировали в 1x PBS. mBFT2 в возрастающих концентрациях (0,1 мкг-2,5 мкг), 5 мкл LPS (выделен из 20 мл ETBF и 20 мл NTBF) и pBFT (2,5 мкг и 1 мкг) независимо друг от друга были смешаны с эритроцитарной суспензией в круглодонном 96-луночном планшете. Независимо mBFT2 (2 мкг) смешивали с ETBF ЛПС или NTBF ЛПС, а затем готовые растворы смешивали с эритроцитарной суспензии в круглодонном 96-луночном планшете. Положительным считался результат фиксированной в течение 10 мин геммаглютинации эритроцитов.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Выбор оптимальной фазы роста бактерий для выделения везикул

Согласно ряду литературных данных, логарифмическая фаза роста является оптимальной для получения значительного количества везикул, в том числе и для *B.fragilis* [3, 118]. Для синхронизации логарифмической фазы роста для обеих бактериальных культур было произведено построение кривых роста по значению оптической плотности суспензионной культуры, измеренной в заданных временных промежутках (Рисунок 12). Середина логарифмической фазы роста была достигнута на 12 часу культивирования для ETBF и 14 часу для NTBF и длилась на протяжении 4-6 часов до наступления стационарной фазы.



**Рисунок 12** Кривые роста бактериальных культур ETBF и NTBF. Для каждой культуры на 3 временных точках (в начале логарифмической фазы роста, в середине и при переходе в стационар) было проведено выделение везикул. Максимальную продукцию везикул определяли согласно тотальной концентрации белка, выделенного из везикул (таблица 2).

Для оценки количества везикул, продуцируемых в разные временные промежутки логарифмической фазы роста, было проведено выделение тотального белка полученных препаратов везикул (таблица 2).

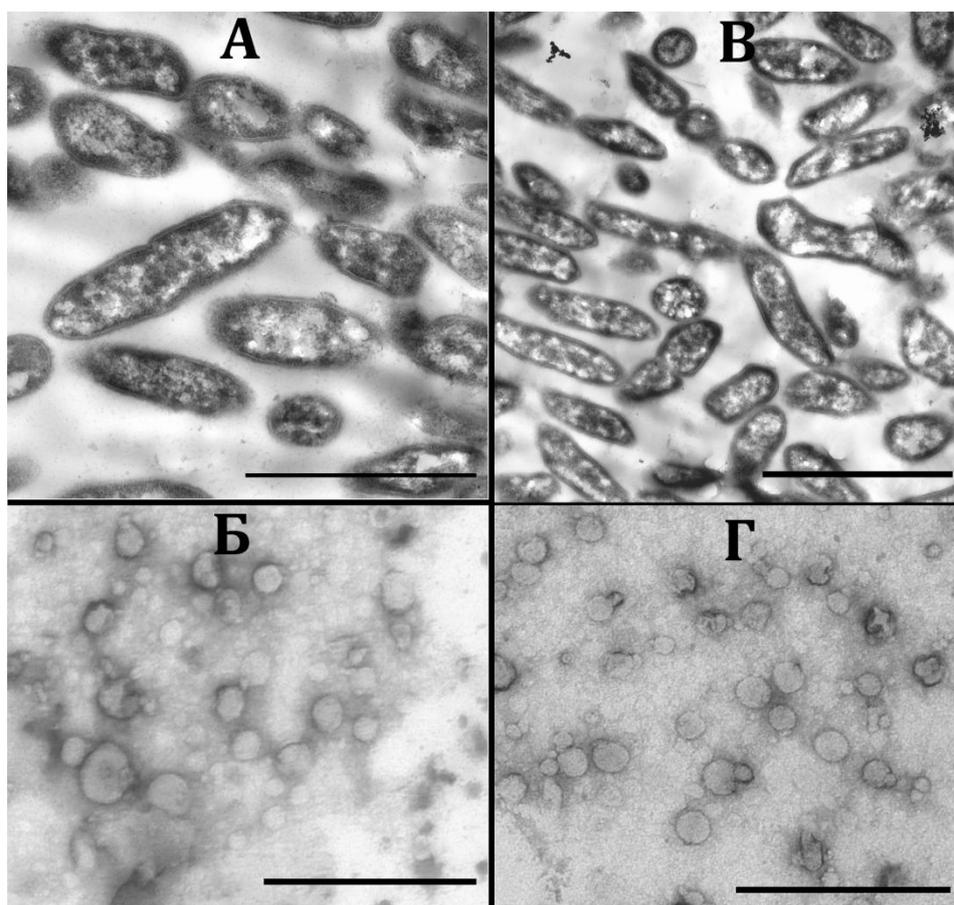
**Таблица 2** Оценка концентрации белка, выделенного из везикул ETBF и NTBF на разных фазах клеточного цикла

Концентрация белка, выделенного из везикул	Начало логарифмической фазы (мкг/мкл) (4 час для ETBF и 6 час для NTBF)	Середина логарифмической фазы (мкг/мкл) (12 час для ETBF и 16 час для NTBF)	Конец логарифмической фазы (мкг/мкл) (16 час для ETBF и 18 час для NTBF)
ETBF	0,6	1,8	2,0
NTBF	0,5	1,6	1,9

Максимальная концентрация белка, выделенного из везикул, в логарифмическую фазу роста была достигнута на 16 часу для ETBF и на 18 часу для NTBF и равнялась 2,0 мкг/мкл и 1,9 мкг/мкл соответственно. Однако, учитывая ряд публикаций, согласно которым по наступлению стационарной фазы может снизиться продукция везикул, но увеличится клеточная гибель, было принято решение - производить выделение везикул в середину логарифмической фазы роста [25].

### **3.2 Электронная микроскопия бактериальных срезов и препаратов везикул**

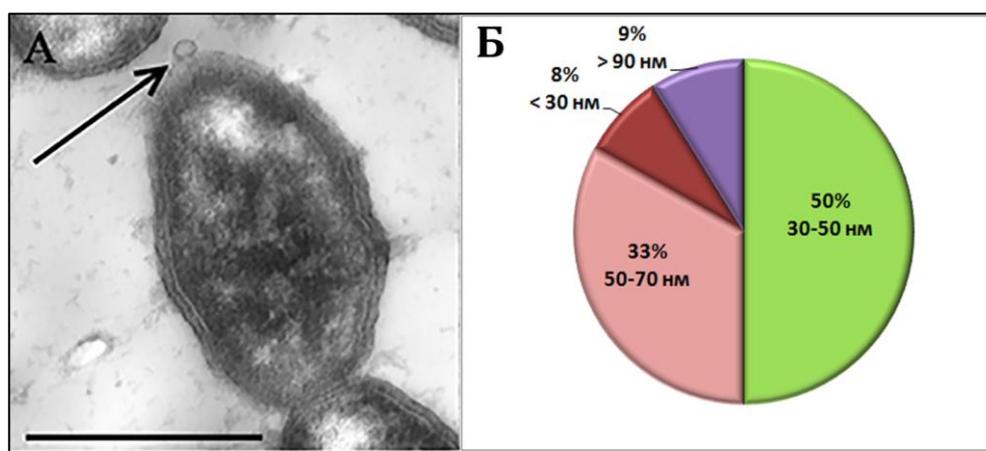
Для анализа морфологии бактерий обоих штаммов и препарата, содержащего везикулы была использована методика негативного контрастирования, а также оценка срезов бактериальных клеток посредством ТЭМ. В ходе анализа бактериальных срезов было отмечено формирование везикул обоих штаммов *B.fragilis* (Рисунок 13).



**Рисунок 13** 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)

Так как метод фиксации и последующего заключения бактериальных препаратов в парафиновые блоки имеет ряд ограничений, сопряженных со сложностью сохранения наноразмерных одномембранных структур, визуально обнаружить обильную продукцию везикул в препаратах не удалось. Таким образом, для оценки относительного количества везикул в препарате был выбран более щадящий способ пробоподготовки, не предполагающий долгосрочной фиксации. Негативное контрастирование позволило выявить в препарате значительное количество везикул, как в случае ETBF, так и NTBF. Кроме того, было показано формирование везикул на поверхности бактериальной клетки (**Рисунок 14А**). Учитывая, что согласно ряду публикаций, размеры везикул могут составлять от 20 до 150 нм для разных бактерий относительно их размера, то ожидаемый размер везикул - от 20 до 80 нм [25, 57, 80-82, 119-121]. При

визуальной оценке порядка 1000 везикул в различных препаратах ЕТВФ и НТВФ был определен диапазон размеров везикул *B.fragilis* обоих штаммов, который составил от 20 до 100 нм (**Рисунок 14Б**). Во избежание возможной контаминации препарата везикул бактериальными клетками, аликвота PBS, содержащего везикулы была нанесена на чашки Петри с необходимой питательной средой. Культивация проходила в анаэробных условиях. Образование сероватых колоний, характерных для *B.fragilis* не было выявлено. В качестве контроля было произведено культивирование бактериальной культуры в аналогичных условиях.



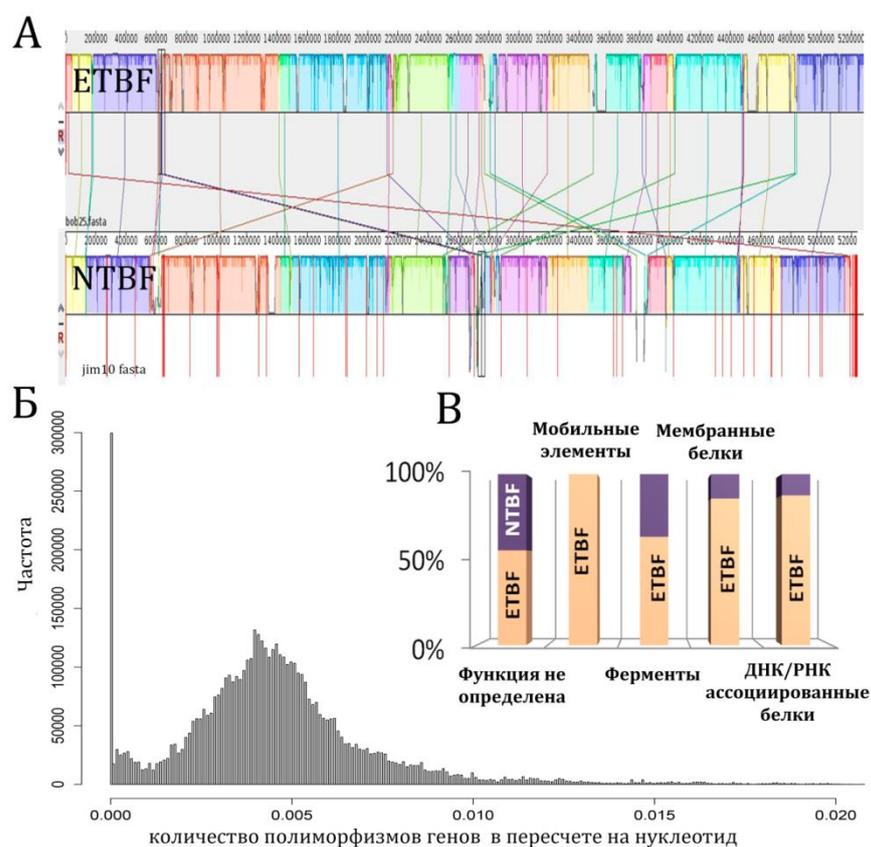
**Рисунок 14** Оценка размеров везикул, выделяемых ЕТВФ и НТВФ. А – ультратонкий срез препарата бактериальной культуры ЕТВФ в процессе выделения везикулы. Формирующаяся везикула выделена стрелкой. Масштабный отрезок равен 500 нм. Б – Круговая диаграмма, отражающая процентное соотношение размеров везикул, определенных в ходе подсчета 1000 везикул в препаратах негативно контрастированных везикул ЕТВФ и НТВФ. (ТЭМ выполнена Вишняковым И.И., сотрудником лаборатории структурной организации генома, ФГБУН Институт цитологии РАН)

После выделения содержащей везикулы фракции из 250 мл суспензионной культуры, было произведено измерение концентрации общего белка препаратов ЕТВФ и НТВФ везикул. Согласно полученному результату концентрация белка в анализируемых препаратах везикул была определена в пределах от 0,8 до 2,1 мкг/мкл.

### 3.3 Генетический анализ исследуемых бактериальных штаммов

При сравнении геномов двух анализируемых штаммов была выявлена значительная генетическая гомология (**Рисунок 15 А, Б**). Основным отличием явилось наличие островка патогенности (VfPAI), представленного у токсигенного

штамма в пределах конъюгативного транспозона СТn86, состоящего из 63,282 пар оснований. Токсигенный штамм хапактеризовался наличием двух копий транспозона в геноме, разделенных 934,125 парами оснований и ориентированных в противоположных направлениях. Патогенный островок изолята содержал гены *bft2* и металлопротеазы (*mpII*), которые располагались между предполагаемыми генами мобильных элементов (*bfmA*, *bfmB* и *bfmC*). В ходе работы было выявлено несколько областей, которые не показали никакого сходства с NTBF геномной последовательностью, включая профаги и конъюгативные транспозоны (**Рисунок 15 В**). Основные отличия двух штаммов представлены в виде списка генов в **Приложении 8.1**.



**Рисунок 15** Результаты геномного сравнения штаммов ETBF и NTBF (BOB25 и JIM10) согласно данным программного обеспечения Mauve (Multiple alignment of conserved genomic sequence)(Сидней, Австралия) А – Общий сравнительный анализ геномов ETBF и NTBF. Одинаковые цвета отражают гомологичные участки генома обоих штаммов. Б – График распределения полиморфизмов, отражающий разницу геномов обоих штаммов. В – Основные генетические отличия ETBF и NTBF штаммов в процентном соотношении к общему количеству отличающихся генов. (Выполнено совместно с Маноловым А. И. сотрудником лаборатории биоинформатики, ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

Таким образом, проведенный анализ продемонстрировал значительную гомологию двух штаммов, использованных в данной работе. Так как везикулы формируются у обоих штаммов, а основным их генетическим отличием является наличие или отсутствие островка патогенности, то можно предположить, что механизмы формирования везикул одинаковы у обоих штаммов и не определяются наличием островка патогенности. На сегодняшний день, существуют гипотезы в возможных вариантах сортинга веществ в везикулы, чем обуславливаются различия в содержании и представленности отдельных компонентов [3]. Однако для данной работы основополагающим фактором для проведения всех последующих сравнительных процедур явилась генетическая гомология штаммов.

### 3.4 Сравнительное протеомное исследование везикул

Генетическая гомология, выявленная для двух анализируемых штаммов, позволила предположить, что механизм формирования везикул является одинаковым. Однако предположить, что механизм сортинга белка у двух штаммов будет совпадать - нельзя, ввиду наличия островка патогенности. Данный геномный фрагмент токсигенного штамма содержит более 60 белков с неопределенной функцией, которые могут обуславливать не только качественные различия содержания определенных белков, но и способствовать формированию иного механизма сортинга белка.

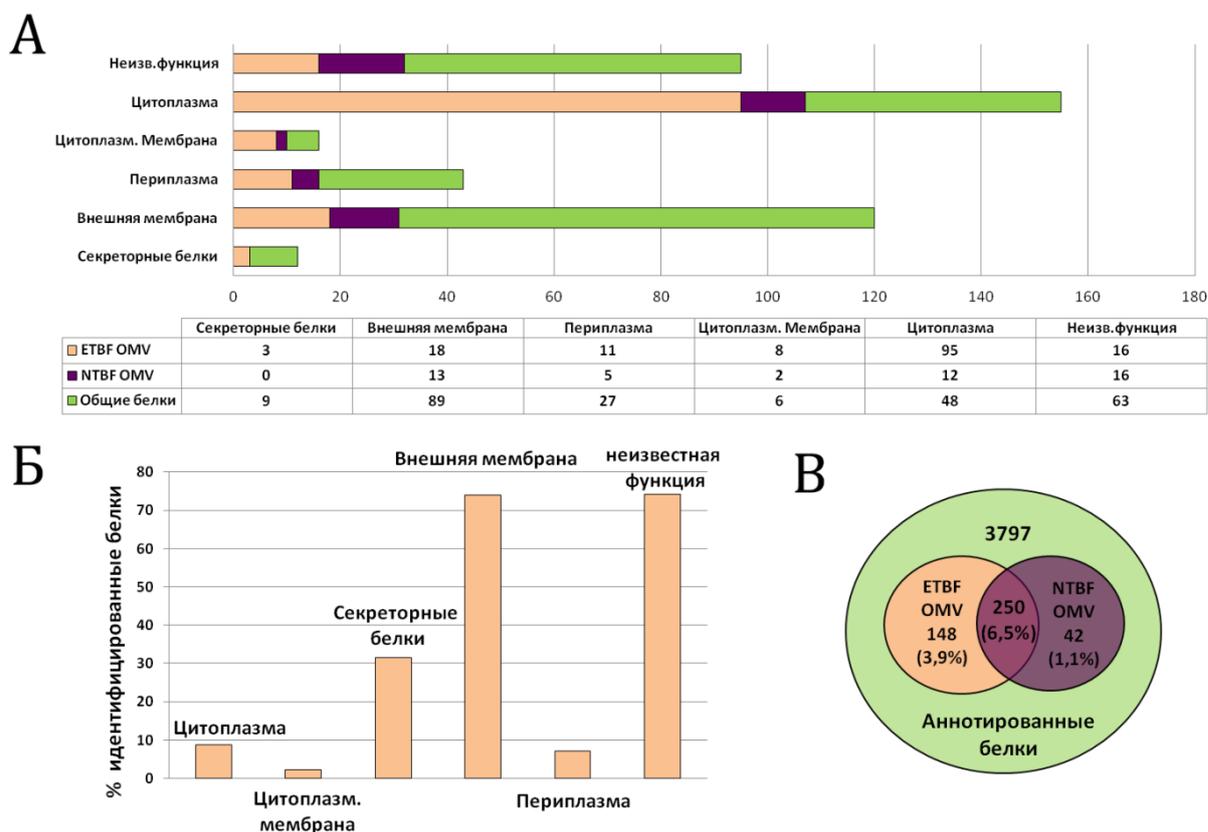
Островок патогенности содержит 64 открытые рамки считывания, из которых значительное количество белковых продуктов может быть представлено в везикулах. Полный перечень генов островка патогенности представлен в **Приложении 8.2**. Кроме упомянутых генов, островок патогенности также содержит ген основного фактора вирулентности - токсин BFT2, определяющий провоспалительные эффекты. В связи с этим было высказано предположение о возможности секреции и доставки данного токсина посредством везикул. Для полноценного анализа всех белков, которые могут быть доставлены до клеток мишеней посредством везикул у ETBF и в сравнении с ним NTBF штаммов, а

также проверки гипотезы о наличии токсина в составе везикул было проведено полное протеомное исследование везикул обоих штаммов *B.fragilis*.

### 3.4.1 Структурные белки и их сублокализации

Выделенные и очищенные везикулы, а также бактериальные клетки обоих штаммов были проанализированы независимо друг от друга с использованием методов протеомного анализа. Согласно литературным данным, количество выявляемых в везикулах белков для других бактериальных видов находится в диапазоне от 100 до 400 [3, 80, 81, 122]. Для протеомного исследования были подготовлены образцы везикул двух штаммов в трех биологических повторах, а также фракционированные клеточные лизаты или отдельные образцы мембранной и цитоплазмной фракции клеток. В ходе комплексного анализа протеомов NTBF и ETBF везикул и клеток было проведено 49 независимых анализов подготовленных образцов и получено 2,430,656 MS/MS-спектров. В общей сложности было идентифицировано 17,644 уникальных пептидов, согласно данным протеогеномной аннотации по базе данных ProtDB, подготовленной для ETBF (BOB25) штамма. Так как штаммы характеризовались рядом генетических отличий, то для NTBF был проведен независимый поиск белков отличных от ETBF. Однако выявить белки, гены которых, согласно геномному сравнению отличали два штамма, в протеоме везикул не удалось. Общее число идентифицированных по двум или более пептидам белков составило 1,465 во всех экспериментах, включая клетки и везикулы. Значения FDR представлены в **Приложении 8.2.**

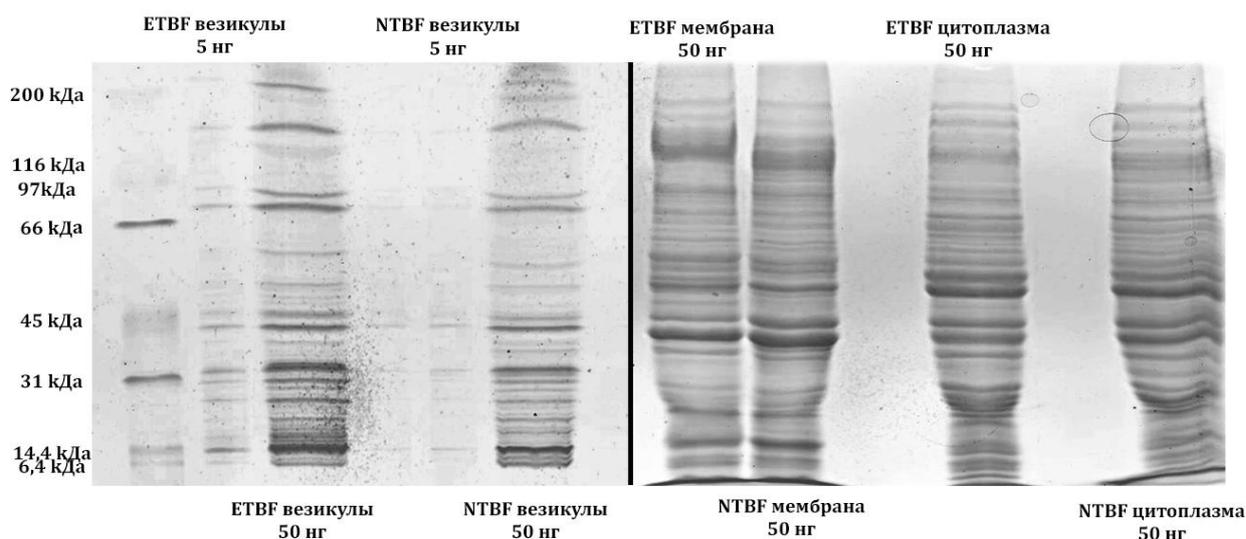
В ходе протеомного анализа везикул ETBF и NTBF удалось идентифицировать 823 белка (**Приложение 8.3-8.5**). Однако для дальнейшего анализа был использован только 431 белок, который идентифицировался, по меньшей мере, в двух из трех независимых биологических повторах. Для ETBF везикул, было определено 393 белка, а для NTBF везикул - 290 белков. Все выявленные белки были сортированы согласно клеточной локализации посредством программного обеспечения PSORTb 3.0[123, 124] (**Рисунок 16**)



**Рисунок 16** Распределение идентифицированных белков везикул ETBF и NTBF согласно их клеточной локализации. А – Предсказанная клеточная локализация белков, выделенных их везикул (OMV) ETBF и NTBF согласно данным базы PSORTb 3.0.(Improved protein subcellular localization). Цифры в таблице представляют точное количество идентифицированных белков в везикулах для каждого компартмента. 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)

Согласно полученным данным значительное количество белков, выявленных в везикулах обоих штаммов, было идентичным. Так среди обнаруженных белков наружной мембраны, была определена группа TonB белков, среди которых были представлены TonB-зависимые рецепторы и TonB-сшитые белки наружной мембраны. Особенностью данной группы является их способность, в составе мембранного многокомпонентного комплекса, импортировать продукты клеточной деградации (например, Rag A) или углеводов (например, SusC) в качестве питательных веществ [125, 126]. Примечательно, что

данный комплекс был обнаружен в везикулах, так, как согласно одной из гипотез, формирование везикул происходит с участием внешней мембраны. В некоторых работах по изучению протеома везикул различных бактериальных видов, белки группы TonB являются независимыми маркерами качественного выделения везикул [3]. Но они не являются единственными маркерами везикул, так как часто в препарате везикул присутствует значительное количество разрушенных клеток, а именно мембран. Поэтому о чистоте выделенного препарата везикул судят по наличию качественных отличий протеомов везикул и мембраны клетки, что было экспериментально подтверждено и в данной работе. Как видно из **рисунка 17**, протеомные профили везикул и мембраны не совпадают, что является существенным доказательством в пользу обоснованности применения указанного способа выделения везикул.



**Рисунок 17** Электрофореграмма белков везикул ETBF и NTBF штаммов. Электрофореграмма демонстрирует различный профиль белка по сравнению с цитоплазмой мембранной клеточными фракциями. 5 и 50 мкг очищенного препарата ETBF и NTBF везикул, а также 5 и 50 мкг препаратов клеточных фракций разделяли посредством 10% ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси.

Кроме мембранных белков, в протеоме, согласно моделям формирования везикул, должны присутствовать белки периплазмы. Как предлагалось ранее, формирующаяся везикула построена из внешней мембраны бактерии, со значительным количеством периплазматических белков. При этом, в предыдущем

и единственном исследовании, посвященном анализу везикул нетоксигенного штамма *B.fragilis*, отмечалась ферментативная активность везикул по отношению к ряду субстратов [3]. Найденные в составе протеома везикул ферменты относились в основном к классу гидролаз. Полученные ранее для протеома NTBF результаты были подтверждены и дополнены данными по протеому ETBF [3]. У обоих штаммов было определено значительное разнообразие гидролаз. Были выявлены, как общие для двух штаммов, так и отличные гидролазы. Так как одной из подтвержденных функций ферментов везикул является утилизация полисахаридов на поверхности эпителиальных клеток путем гидролиза, то наличие значительного разнообразия гидролаз в везикулах является косвенным подтверждением роли данных структур в процессе дистанционного ферментативного расщепления полисахаридов [3].

Кроме белков внешней мембраны в составе везикул были также идентифицированы белки цитоплазматической мембраны, вероятно попавшие туда в результате неспецифического захвата. Среди белков цитоплазматической мембраны ETBF, были выявлены пробелок субъединицы транслоказы SecD и субъединица флавопротеида сукцинатдегидрогеназы участвующие в цикле Кребса [127]. Кроме того, в ETBF везикулах был выявлен белок клеточного деления FtsH являющийся  $Zn^{2+}$  АТФ + -зависимой металлопротеазой, которая прикрепляется к цитоплазматической мембране с помощью двух трансмембранных сегментов таким образом, что очень короткий амино- и длинные карбоксильные концы обращены в цитоплазму [128]. Для NTBF везикул, был обнаружен только один отличный от белков ETBF везикул цитоплазматический мембранный белок - тиолдисульфидный белок (VU15\_RS13775), который характеризуется дисульфид изомеразной и оксидоредуктазной активностью [129]. Интересно, что среди общих белков цитоплазматической мембраны был выявлен флагеллярный белок MotA. Принимая во внимание, что *B.fragilis* не имеет жгутиков, этот белок может действовать как протонная помпа, способствующая потоку протонов за пределы

бактериальной клетки для поддержания требуемого клеточного рН и заряда мембраны соответственно [130].

Белки наружной мембраны и периплазмы являются обязательными компонентами везикул, но белки цитоплазмы редко определяются. Ранее в литературе не допускалось суждения о том, что в состав везикул могут быть включены белки цитоплазмы [25]. Авторы предполагали, что их наличие может являться следствием загрязнения препарата везикул в результате, например, клеточной гибели [121]. Однако позже, были опубликованы работы, описывающие белки цитоплазменного происхождения в составе везикул [118]. Важно отметить, что среди данных белков определенное количество составляли ферменты. Учитывая тот факт, что в работе были использованы генетически близкие штаммы *B.fragilis* было удивительным наблюдать существенную разницу в количестве выявленных цитоплазматических белков (**Рисунок 16А**). Так для ЕТВФ везикул количество выявленных цитоплазматических белков составило 95 или приблизительно 30% от всех идентифицированных белков ЕТВФ везикул, для которых была определена клеточная локализация. В сравнении с ЕТВФ количество цитоплазматических белков, выявленных в НТВФ везикулах составило лишь 20%. Для обоих типов везикул было выявлено 48 общих белков и 12 белков уникальных только для НТВФ везикул, при этом порядка 95 уникальных белков цитоплазмы было выявлено в ЕТВФ везикулах (**Рисунок 16В**). По сравнению с НТВФ везикулами, в ЕТВФ были определены компоненты системы трансляции РНК, в том числе факторы элонгации G, Ts, Tu, фактор инициации трансляции белка IF-2 и значительное количество субъединиц рибосомных белков. В НТВФ везикулах были выявлены компоненты аппарата трансляции белка, такие как 50S субъединица (L7 / L12). Кроме того, были идентифицированы белки, участвующие в процессах репликации ДНК и транскрипции. В сравнении с токсигенным штаммом, НТВФ везикулы содержали только два компонента трансляции белка - факторы элонгации G и Tu, и не содержали каких-либо белков, участвующих в процессах репликации ДНК или транскрипции. Выявленная

группа цитоплазмических белков включала в себя также несколько молекулярных шаперонов, участвующих в процессе деградации РНК. Некоторые из этих шаперонов были общими для двух типов везикул. Примечательно, что среди белков цитоплазмического происхождения были выявлены те, которые могут опосредовать ответ на стрессовое воздействие. Так были выявлены такие белки, как Пирин, негемовый ферритин, группа тиоредоксинов, а также белок, активность которого повышена в случае клеточного голодания – PhoH [131, 132].

Пирин, который был найден исключительно в везикулах ЕТВФ, является белком ответа на стресс у цианобактерий и может действовать как кверцетиназа у *Escherichia coli*, однако функции пириновых ортологов в прокариотах остаются в основном неопределенными [132]. Негемовый ферритин, идентифицированный также в везикулах ЕТВФ, обладает особой окислительно-восстановительной активностью, способствуя связыванию трехвалентного железа [133]. Тиоредоксины представляют собой белки, которые действуют как антиоксиданты, способствуя восстановлению других белков посредством цистеин-тиолдисульфидного обмена [134]. Белок PhoH активируется в ответ на ограничение фосфата [135]. Анализ транскриптомов показал, что делеция PhoB влияет на экспрессию 585 генов ( для генов с более чем 4-кратным изменением) у *B. fragilis*, включающих гены для ответа на стресс (шапероны и белки теплового шока), вирулентности (биосинтез капсульных полисахаридов) и метаболизм фосфатов.

Важно отметить, что в отличие от белков клеточного цикла, назначение которых в везикулах пока не является определенным, белки, способствующие ответу на стрессовое воздействие, могут появляться в везикулах в двух случаях. В первом, в ходе культивации бактерии могут испытывать неблагоприятные воздействия, такие как избыточная или недостаточная температура, изменение кислотно-основного состояния среды и др. Выработываемые в ответ на подобное воздействие белки могут отчасти упаковываться в везикулу. Важно отметить, что вероятность подобного явления мала, так как обилие стрессовых белков в

везикулах было характерно скорее для ETBF, чем для NTBF, а культивация бактерий происходила в одинаковых условиях в пределах одного анаэробного состояния. Можно также предположить, что для токсигенного штамма данные условия культивации не являются идеальными, в отличие от NTBF, что и стало причиной появления белков ответа на стресс. Полный перечень идентифицированных белков везикул согласно клеточных компартментов указан в **Приложении 8.3**.

Кроме качественного сравнения протеомов везикул обоих штаммов была проведена и относительная количественная оценка содержания белков (**Таблица 3**). Однако, выявить существенную разницу в количественной представленности удалось лишь для некоторых белков, среди которых углевод-связывающие белки, ряд мембранных белков группы TonB связанных рецепторов и такие ферменты, как  $\beta$ -N-ацетилгексоминидаза и метионин сульфаксид редуктаза, обнаруженные исключительно в ETBF везикулах.

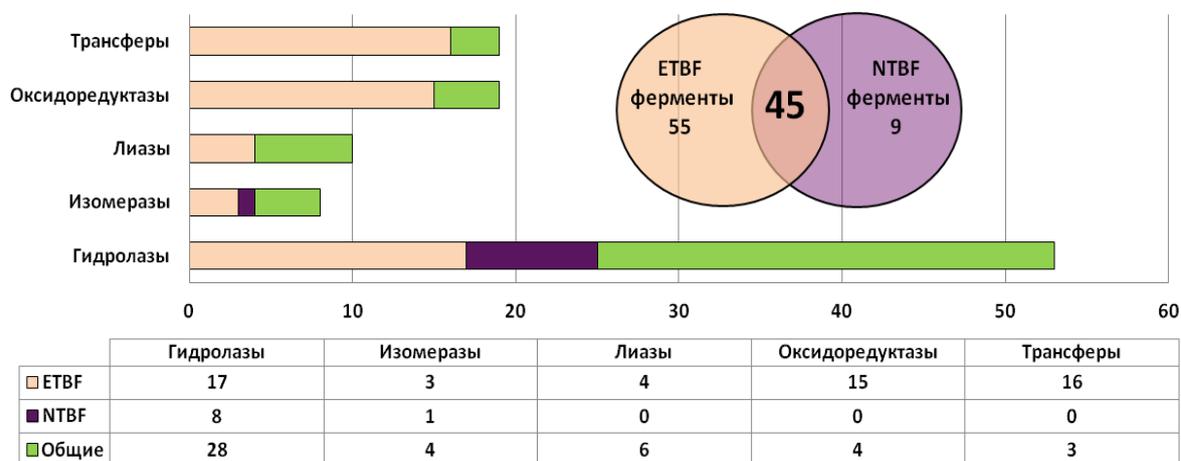
**Таблица 3** Количественное сравнение протеомов везикул ETBF и NTBF.

ИД белка	Название белка	p value	log <sub>2</sub> (emPAI NTBF/ emPAI ETBF) везикулы
VU15_RS07335	membrane protein	0,00342588	5,3
VU15_RS15060	glycoside hydrolase family 29	0,00342588	Только в ETBF
VU15_RS17085	patatin	0,00342588	Только в ETBF
VU15_RS17145	beta-N-acetylhexosaminidase	0,00342588	Только в ETBF
VU15_RS19280	50S ribosomal protein L4	0,00420932	Только в ETBF
VU15_RS19640	TonB-linked outer membrane protein	0,00567246	Только в NTBF
VU15_RS04595	alkaline phosphatase	0,01318527	Только в NTBF
VU15_RS04390	hypothetical protein	0,01318527	Только в ETBF
VU15_RS07330	membrane protein	0,0144819	3,1
VU15_RS16010	peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	0,0144819	Только в ETBF
VU15_RS13200	carbohydrate-binding protein	0,02147599	2,3

### 3.4.2 Ферменты и метаболические пути

Согласно данным протеомного исследования, везикулы обоих штаммов содержат значительное количество ферментов различного субклеточного происхождения, вовлеченных в биохимические каскады (**Приложение 8.4**).

Выявленные ферменты были соотнесены с 5 классами: гидролазы, изомеразы, лиазы, оксидоредуктазы, трансферазы (**Рисунок 18**).

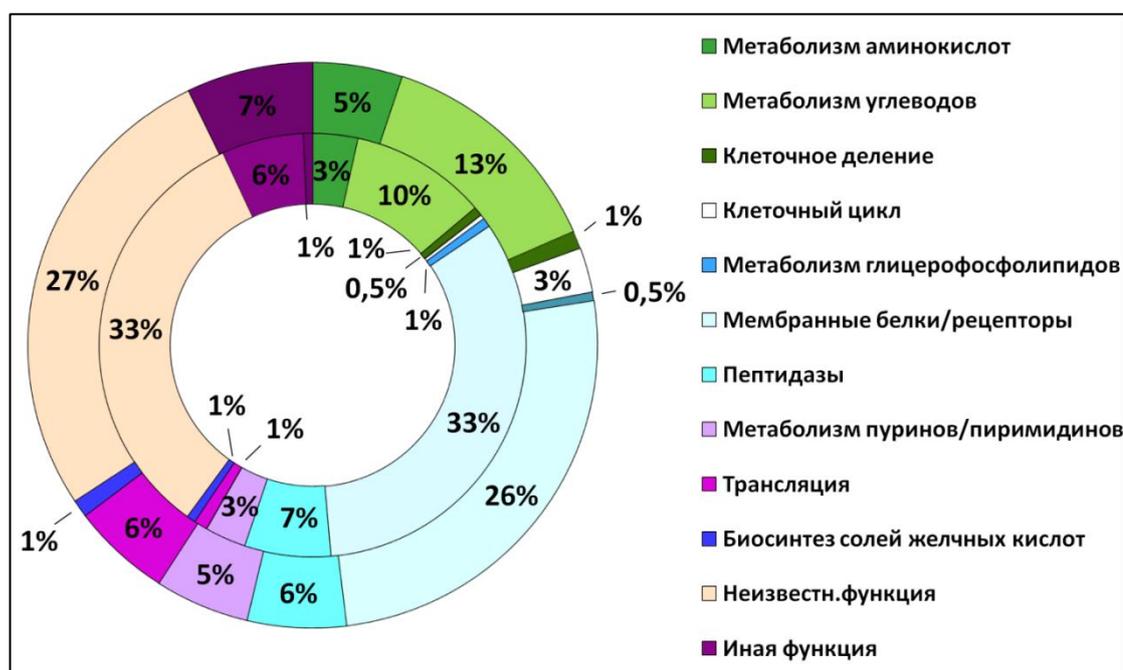


**Рисунок 18** Ферменты, идентифицированные в везикулах ETBF и NTBF. Столбчатая гистограмма отражает распределение ферментов, идентифицированных в везикулах обоих штаммов *B.fragilis* согласно классификации по классам ферментов. Диаграмма Венна представляет сравнительный анализ индивидуальных различий и общее количество ферментов, идентифицированных в везикулах обоих штаммов *B.fragilis*.

Наличие значительного количества белков цитоплазматического происхождения у ETBF было связано с присутствием ферментов. При этом, наборы ферментов у ETBF и NTBF были отличными. Так у токсигенного штамма было выявлено порядка 55 уникальных ферментов, в отличие от NTBF, для которого было обнаружено всего 9 (**Рисунок 18**). Кроме того, как и ожидалось, значительная часть ферментов принадлежала к классу гидролаз или ферментов, осуществляющих ферментативный гидролиз полисахаридов поверхности клеток. При этом, несмотря на тот факт, что гидролазы были приблизительно в равной степени представлены у обоих штаммов, NTBF характеризовался наличием большего разнообразия видов гидролаз, очевидно являясь более адаптированным комменсалом, нежели токсигенный штамм. Оценивая общий пул гидролаз, выявленных у обоих штаммов, стоит отметить, что относительно всех ферментов, выявленных у NTBF, гидролазы составили порядка 76% по отношению к ETBF –

54% (**Рисунок 18**). В отличие от класса гидролаз, изомеразы и выявленные в ходе исследования лиазы были приблизительно поровну распределены между двумя типами везикул. Кроме того, было выявлено значительное количество оксидоредуктаз, в числе которых была глутатионпероксидаза, требующаяся для адаптации к окислительному стрессу [131].

Соотнося выявленные ферменты с различными метаболическими путями, было показано, что большинство ферментов ETBF и NTBF везикул были связаны с углеводным обменом, путями деградации гликанов и аминокислот, а также обменом нуклеотидов (**Рисунок 19, Приложение 8.5**).



**Рисунок 19** 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.

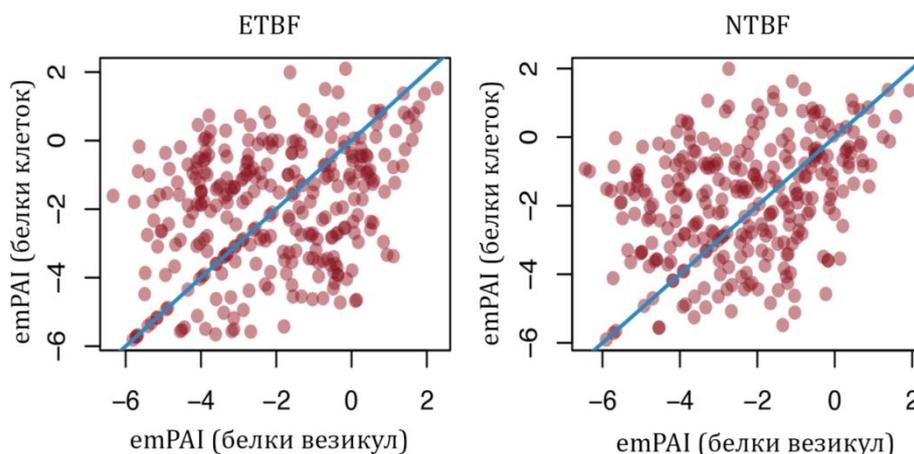
Однако для NTBF везикул значительное количество ферментов данного обмена принадлежало к классу гидролаз, что обеспечивало в основном функцию ферментативного гидролиза полисахаридов. Таким образом, если гидролазы, обеспечивая функцию питания, составляли большинство NTBF ферментов,

участвующих в углеводном обмене, то ферменты, обнаруженные в везикулах ЕТВФ, оказались вовлеченными в основные метаболические пути, способствующие формированию АТФ. Среди данных метаболических путей были показаны такие как, гликолиз, пентозофосфатный путь. Кроме того, только в везикулах ЕТВФ обнаружены ферменты цикла трикарбоновых кислот, что свидетельствует в пользу захвата белков цитоплазматической мембраны с цитоплазмой в ходе формирования везикул. Среди ферментов для обоих типов везикул были выявлены представители пуринового и пиримидинового обмена.

Наличие значительного количества ферментов энергетического обмена в составе везикул ЕТВФ можно объяснить несколькими возможными причинами. Вероятно, путь проникновения данных белков в везикулы может быть опосредован наличием специального механизма сортировки белка. Такое явление уже было показано для ряда микроорганизмов, при этом были обозначены потенциальные механизмы данного процесса [136]. С другой стороны, ферменты гликолиза являются мембраносвязанными, и их проникновение может носить случайный характер. Однако в ходе данного эксперимента ферменты гликолиза удалось бы выявить и у НТВФ, чего не произошло. Таким образом, одним из вероятных событий может являться наличие специального сортировки белка, характерного для токсигенного штамма, механизм которого может быть опосредован различным уровнем экспрессии ферментов, представленных в обоих штаммах. С другой стороны, в литературе описано значительное количество потенциальных механизмов формирования везикул [137]. В этой связи можно предположить наличие ряда особенностей формирования везикул у ЕТВФ, в отличие от НТВФ. Например, в случае с НТВФ везикулы формируются с захватом преимущественно периплазматического содержимого и внешней мембраны. Когда формируются везикулы токсигенного штамма, случается захват и цитоплазматической мембраны, белки которой также были обнаружены в ходе протеомного профилирования.

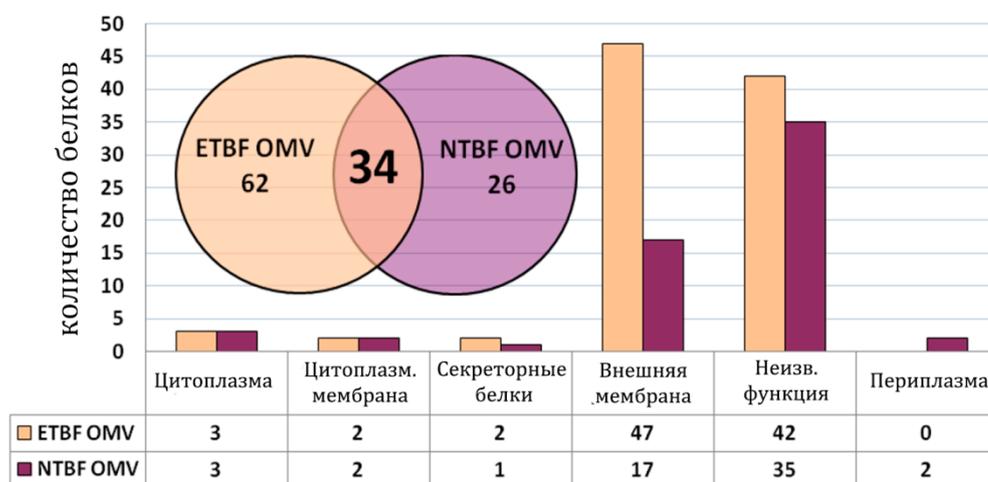
Проверить наличие потенциального механизма сортировки можно проведя сравнение наиболее представленных белков клетки, выявленных в ходе протеомного исследования, по отношению к белкам, определенным в везикулах. Наиболее представленные белки клеток в случае отсутствия сортировки белка должны пассивно попадать в везикулы и определяться в них. Но так как белки распределены в клетке неравномерно, а часть из них составляют основу комплексов, подобное сравнение было бы не возможным. Процесс формирования везикул на поверхности клетки носит случайный характер, что согласуется с данными протеомного профилирования, и вероятно объясняется распределением белковых комплексов в разных клеточных компартаментах.

При оценке результатов сравнительного протеомного исследования клеток и везикул ETBF и NTBF был проведен корреляционный анализ относительной представленности белков (**Рисунок 20**). Как и ожидалось, в ходе анализа полученных данных была продемонстрирована слабая корреляция относительной представленности белков, выявленных в везикулах, по отношению к протеомам сравниваемых клеток. Значения коэффициентов, рассчитанные в ходе корреляционного анализа, были следующими:  $K_{(ETBF)} = 0,32$ ,  $K_{(NTBF)} = 0,43$ .



**Рисунок 20** Диаграмма рассеяния (scatter plot) представленности различных белков идентифицированных в везикулах и клетках ETBF и NTBF. Каждая точка отражает конкретное значение emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index.), рассчитанное для белков, идентифицированных в везикулах и клетках ETBF и NTBF.

Было определено увеличение количества различных белков в обоих типах везикул, которые либо отсутствовали в протеоме клеток, либо составляли минорную часть клеточного лизата. Стоит особо отметить тот факт, что в случае подготовки протеома клеток было проведено предварительное клеточное фракционирование. Известно, что пробоподготовка клеток может влиять на степень доступности белков для будущей идентификации. По этой причине, фракционирование существенно увеличивает шанс получения большего количества белковых identifications и делает правомочным проведение подобного сравнения. Как показано на **рисунке 21** протеомы везикул характеризовались значительным количеством уникальных, не идентифицированных в клетках белков, что являлось одним из подтверждений наличия специального механизма сортировки.

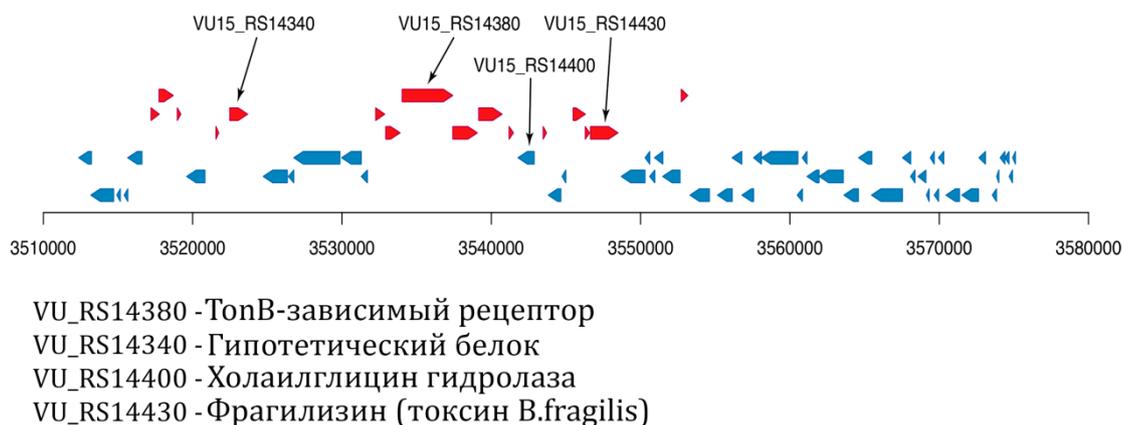


**Рисунок 21** Белки, выявленные исключительно в везикулах и не идентифицированные в клетках ETBF/NTBF. Столбчатая гистограмма демонстрирует распределение белков, эксклюзивно определенных в везикулах и не идентифицированных в клетках ETBF/NTBF в зависимости от клеточной локализации. Диаграмма Венна отражает индивидуальные различия в общем количестве белков, идентифицированных исключительно в везикулах по отношению к общему количеству белков, выявленных только в везикулах, и не определенных в клетках.

### 3.4.3 Факторы патогенности и вирулентности

Одной из важнейших задач в ходе сравнительного анализа протеома везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов являлось обнаружение факторов вирулентности и патогенности. Согласно протеогеномной аннотации в составе островка патогенности (VfPAI), расположенного в пределах конъюгативного

транспозона CTn86 определяется 65 белков, включая главный фактор вирулентности *B.fragilis* – токсин – фрагилизин (**Приложение 8.6**). После тщательного анализа протеома ETBF везикул, было обнаружено несколько белков, принадлежащих к островку патогенности, которые могут быть доставлены к клеткам-мишеням посредством везикул: 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) (**Рисунок 22**). Интересно отметить, что холоилглицин гидролаза была ранее описана, как участник процесса конъюгации желчных кислот, еще одной функции *B.fragilis*, которая объединяет оба описываемых в работе штамма и является уникальной характеристикой данного бактериального рода [38]. Интересно, что у токсигенного штамма, имеется две копии гена, кодирующего холоилглицин гидролазу. Таким образом, токсигенный штамм производит двойную дозу данного фермента, способствуя, вероятно, защите бактерии от негативного влияния желчных кислот.



**Рисунок 22** Схема генетической организации островка патогенности *B.fragilis* согласно данным протеогеномного анализа. Стрелками отмечены белки, выявленные в ходе анализа протеома в везикулах ETBF

Несмотря на тот факт, что другие белки, кодируемые генами островка патогенности обнаружены не были, особое внимание стоит уделить белку–

пататину, не входящему в данный островок, однако обладающему значительным потенциалом патогенности. Выявлен пататин был только в везикулах патогенного штамма. Данный белок был впервые описан у растений, как гликопротеин с липид-ацилгидролазной активностью [138]. Позднее пататин был обнаружен в геноме *Toxoplasma gondii* и предположительно вовлечен в процесс взаимодействия организма хозяина и бактерии [138]. А в одном из последних исследований было показано, что пататин *Pseudomonas aeruginosa* может быть активирован убиквитином хозяина [139]. Таким образом, пататин, поступающий в клетку – мишень посредством слияния везикулы и мембраны эукариотической клетки может быть активирован убиквитином. Так как пататин потенциально характеризуется липолитической активностью, можно предположить, что будучи активированным, он будет способствовать разрушению мембранных органел, приводя клетку к апоптозу или некрозу.

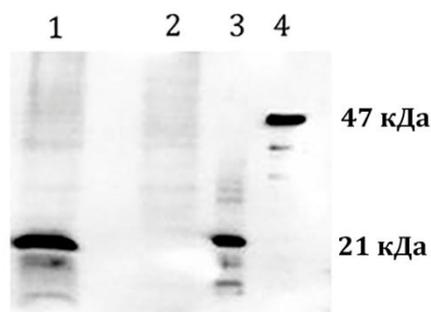
В ходе протеомного анализа везикул, особенно белков, принадлежащих к островку патогенности, основное внимание было отведено на поиск токсина – фрагилизина. Однако, как и предполагалось, данный способ пробоподготовки, включающий обработку белков трипсином, не способствовал обнаружению токсина, так как согласно литературным данным фрагилизин имеет относительную устойчивость к протеолитическому протеолизу посредством трипсина [140]. Кроме того, относительная представленность токсина в смеси белков может оказаться низкой, поэтому было предложено провести поиск токсина альтернативными методиками, включающими методы детекции, опосредованные реакцией антиген-антитела. К данным способам поиска относятся иммуноблот и ТЭМ с применением антител, меченных золотом.

До 2016 года ничего не было известно относительно процесса созревания токсина. Однако в работе Choi и соавторов было показано, что белок, являющийся цистеиновой протеазой – клострипейн способствует процессингу фрагилизина [20]. Примечательно, что данный белок был выявлен в ходе нашего исследования в обоих типах везикул. При этом как показали авторы публикации клострипейн

может быть не активным у непатогенных штаммов из-за наличия генетической мутации. Согласно результатам секвенирования NTBF на С-конце белка была выявлена замена Q/L, ранее не показанная в работе Choi и соавторов, потенциально способствующая модификации активности данного белка у непатогенного штамма.

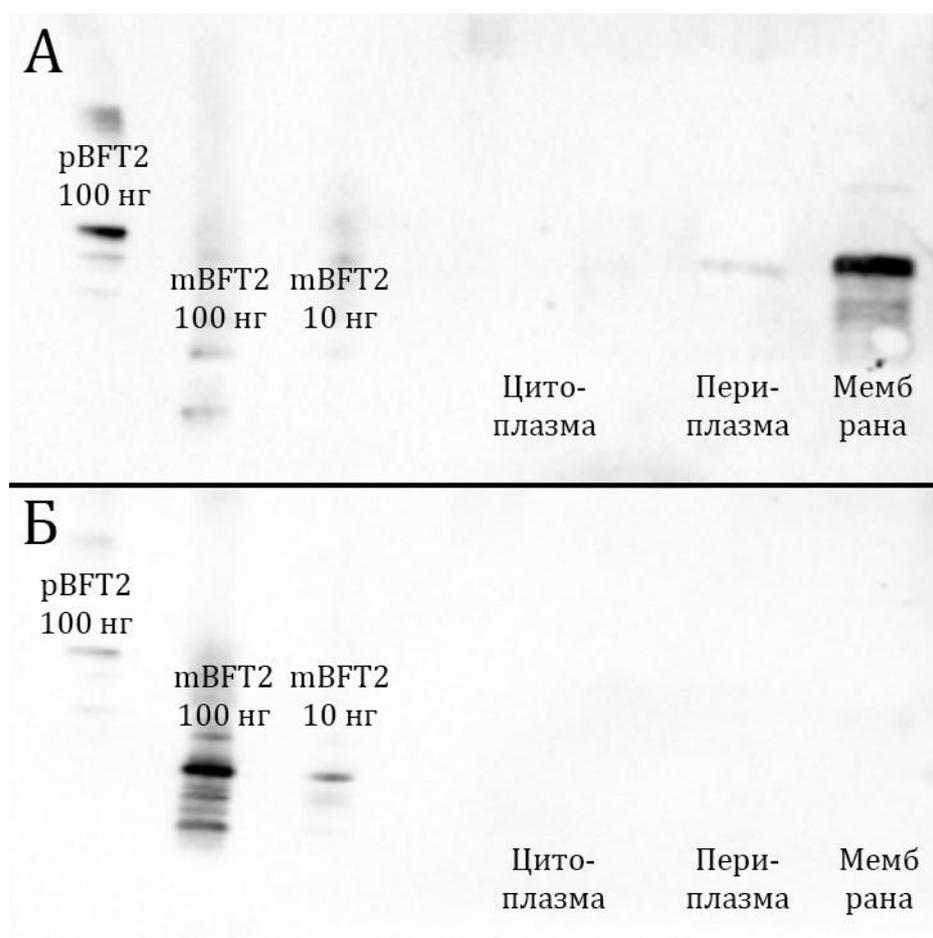
### 3.5 Идентификация токсина методами вестерн-блота и электронной микроскопии с применением антител против токсина, меченых золотом

Так как метод ВЭЖХ-МС/МС не способствовал обнаружению токсина (BFT2) по ряду причин, включая относительно малую его представленность, были предприняты попытки поиска токсина с использованием альтернативных методик, таких как вестерн-блот и ТЭМ с применением антител, меченных золотом. Для обнаружения BFT2 методом вестерн-блота с использованием поликлональных антител (анти-BFT2), специфичных по отношению к рBFT2 было проанализировано 40 мкг тотального белка, выделенного из ETBF и NTBF везикул, что эквивалентно анализу 250 мл жидкой культуры *B.fragilis* обоих штаммов. В результате, во фракции везикул нами был обнаружен токсин в процессированной форме (mBFT2), что подтверждало предположение о возможном участии везикул в процессе секреции токсина (**Рисунок 23**).



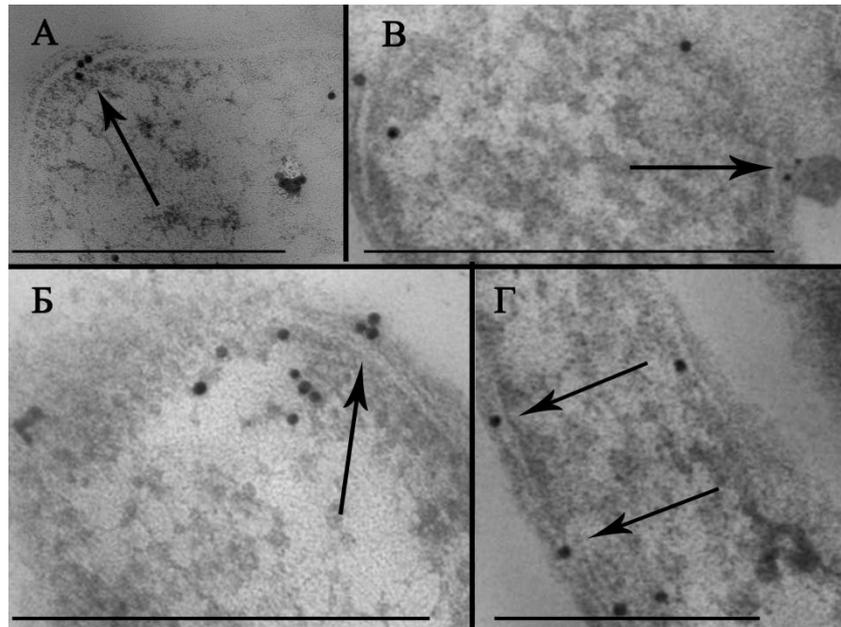
**Рисунок 23** Иммуноблот препарата везикул ETBF и NTBF с использованием антител против BFT2. 5 мкг белка, выделенного из препаратов везикул ETBF (1) и NTBF (2) штаммов было взято для проведения ПААГ электрофореза с последующим иммуноблотом. В качестве контроля были использованы по 100 нг рекомбинантных форм белка – BFT2. Незрелая форма – 3 и процессированная форма токсина – 4.

Так как ранее было высказано предположение, что токсин является свободно секретируемой протеазой, дополнительно методом иммуноблота был произведен поиск токсина в культуральной среде, не содержащей везикулы. При этом 100 мл культуральной среды не содержащей везикулы лиофилизировали и анализировали с помощью вестерн-блота с применением поликлональных антител (анти-BFT2). Обнаружить токсин не удалось. Кроме того, обнаружить непротессированную форму токсина (pBFT2) также не получилось ни в препарате везикул, ни в культуральной среде, свободной от токсина. Таким образом, согласно полученным данным токсин попадал в везикулы в протессированном виде. Так как основной фермент, участвующий в процессинге токсина – клострипейн (цистеиновая протеаза) был также обнаружен в везикулах, можно предположить, что созревание фрагилизина происходит в везикуле или в периплазме, где шанс попадания обоих белков в состав протеома везикулы очень большой. Так как протеом везикул токсигенного штамма содержит значительное количество цитоплазмических белков, процессинг может осуществляться и в цитоплазме клетки, однако, как правило, активация бактериальных токсинов редко происходит в пределах клетки, где могут быть подвергнуты протеолитическому расщеплению собственные структуры бактерии. Чтобы оценить какая из структур бактериальной клетки в большей степени накапливает токсин, в ходе данной работы также было проведено исследование мембранной, периплазматической и цитоплазмической клеточных фракций. В результате была обнаружена непротессированная форма токсина - pBFT2 в мембранной фракции и небольшое ее количество в периплазме клеток ETBF. Так как ВЭЖХ-МС/МС анализ некоторых клеточных фракций (цитоплазмической и мембранной) был выполнен уже на предварительном этапе, то точность определения белка именно в мембранной фракции (отсутствие значимой контаминации данной фракции белками цитоплазмы) была достаточно большой. Чего нельзя сказать о периплазме, выделение которой сложно методологически и является условным (Рисунок 24).



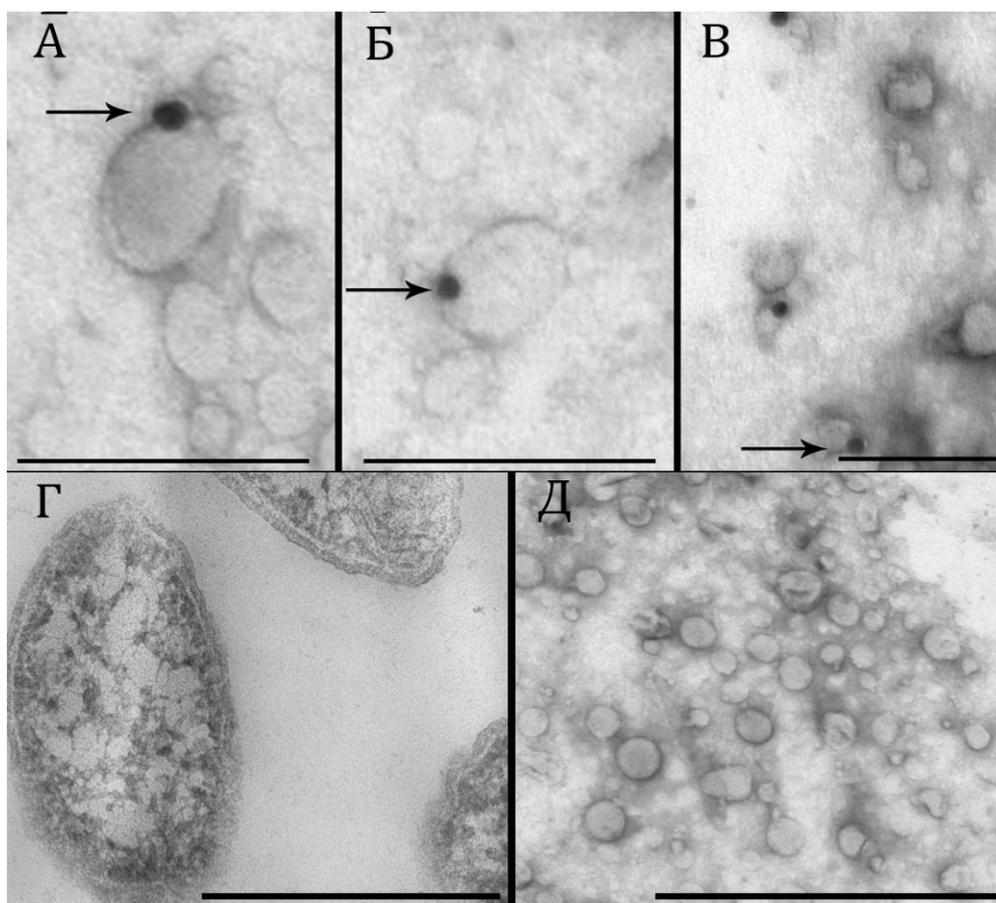
**Рисунок 24** Иммуноблот клеточных фракций. Для анализа было взято по 1 мкг следующих клеточных фракций ETBF и NTBF: цитоплазменная, периплазменная и мембранная. После проведения ПААГ электрофореза с последующим иммуноблотом был проведен анализ локализации токсина. Для контроля были использованы две рекомбинантные формы токсина (100 нг каждого и 10 нг mBFT2).

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 25**). На одном из снимков можно было наблюдать фиксацию антител на формирующейся везикуле (**Рисунок 25 В**).



**Рисунок 25** Микрофотографии срезов бактериальных клеток. Идентификация BFT2 методом электронной микроскопии с применением антител конъюгированных золотом. А-Г ультратонкие срезы клеток ЕТВФ 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.

Данным способом были также исследованы препараты везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов. В результате метка золота была обнаружена на мембране везикул (**Рисунок 26 А-В**). В контроле частицы золота не выявлялись (**Рисунок 26 Г,Д**).



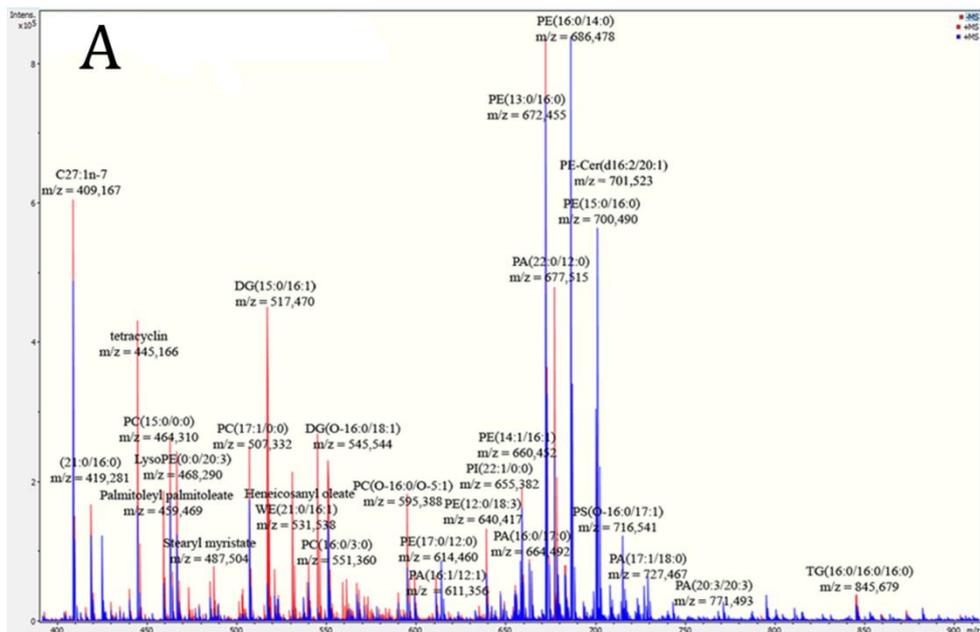
**Рисунок 26** Микрофотографии бактериальных срезов и препаратов везикул. Идентификация BFT2 методом электронной микроскопии с применением антител конъюгированных с частицами золота. А-В - препараты везикул с фиксированными на поверхности антителами с частицами золота (черные стрелки), оцененные методом электронной микроскопии в режиме негативного контрастирования. Г- ультратонкий срез культуры NTBF и Д – везикулы NTBF использованы для контроля специфичности антител против BFT2. Масштабные отрезки для А,Б – 100 нм, для В – 150 нм, для Г – 600 нм, для Д – 400 нм.

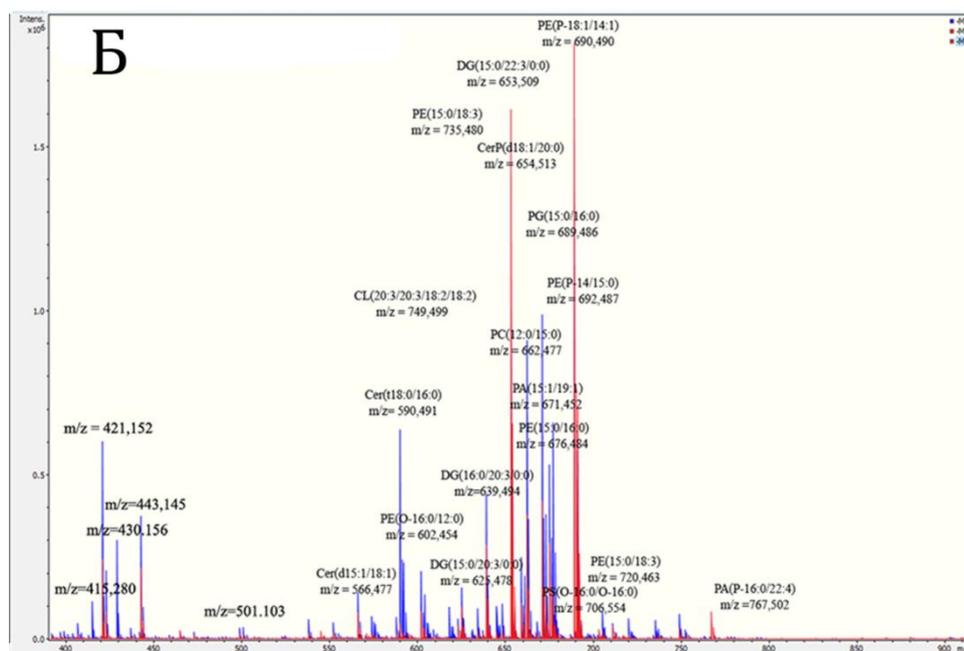
Полученные нами результаты и их анализ, позволил заключить, что взаимодействие специфических антител с токсином на поверхности клеток и везикул свидетельствует о наличии высокой степени тропности фрагилиза к мембране клетки, и как следствие – к везикулярной мембране. Подобное взаимодействие не является уникальным и ранее было продемонстрировано для токсина *E. coli*, где специфическая структура ЛПС была необходима для мембранного связывания токсина с везикулами [73]. В дальнейшем, необходимо было выполнить ряд экспериментов, подтверждающих высокое сродство токсина к мембране бактериальной клетки. Предварительно был проведен анализ липидома клеточной мембраны с целью определения наиболее представленных

липидов, а также независимый анализ структуры ЛПС обоих штаммов, ранее описанный только для нетоксигенного штамма [3].

### 3.6 Липидное исследование

Для исследования компонентов мембраны *B.fragilis*, с которыми потенциально может взаимодействовать токсин, был применен способ анализа липидов методом прямого ввода образца (Shot-gun). Для этой цели отдельно были выделены липиды мембраны бактерии и липополисахарид (ЛПС). Важно отметить, что липиды и ЛПС выделяли из мембран целых клеток, а не везикул. Так в ранее проведенном исследовании, была продемонстрирована идентичность строения клеточной и везикулярной мембраны [3]. При фрагментации спектров мембранных липидов, в первую очередь были обнаружены характерные ионы полярных групп фосфолипидов, переменных остатков жирных кислот, способных образовывать сложные эфиры диацилглицеринацилтрансфераз, циклы и другие соединения с потерей воды (**Рисунок 27**).





**Рисунок 27** Полные спектры масс липидов, выделенных из клеточных мембран ETBF и NTBF. А – масс-спектрометрический анализ липидом мембраны ETBF (спектр окрашен в красный цвет) и NTBF (спектр окрашен в синий цвет) в режиме положительных ионов. Б- масс-спектрометрический анализ липидом мембраны ETBF (спектр окрашен в красный цвет) и NTBF (спектр окрашен в синий цвет) в режиме отрицательных ионов

Полный перечень выявленных ионов показан в **таблице 4**. Как и следовало ожидать, наиболее представленные ионы в спектре принадлежали к классам фосфатидилэтаноламина (PE), фосфатидилхолин (PC) и диацилглицерина (DG).

**Таблица 4** Перечень идентифицированных липидов мембран ETBF и NTBF, полученных в ходе масс-спектрометрического анализа в режиме положительных и отрицательных ионов

Метаболиты (Режим положительных ионов)	m/z	$\Delta ppm$	Аддукт
PC fragment or C27:1n-7	409,168	0	[M+H] <sup>+</sup>
(21:0/16:0) fragment	419,282	3	[M+2Na] <sup>2+</sup>
Tetracyclin	445,166	1	[M+H] <sup>+</sup>
Palmitoleyl palmitoleate	459,470	28	[M+H- H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
PC(15:0/0:0)	464,310	2	[M+H- H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
PC(17:1(10Z)/0:0)	507,333	0	[M+H] <sup>+</sup>
DG(15:0/16:1)	517,470	14	[M+H] <sup>+</sup>
Heneicosanyl oleate WE(21:0/16:1)	531,538	0	[M+H- H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
DG(O-16:0/18:1)	545,545	0	[M+H- 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
PC(16:0/3:0)	551,360	6	[M+H] <sup>+</sup>
PC(O-16:0/O-5:1)	595,388	11	[M+2Na-H] <sup>+</sup>
PA(16:1(9Z)/12:1)	611,356	0	[M+Na] <sup>+</sup>
PE(17:0/12:0)	614,460	7	[M+H- 2 H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
PE(12:0/18:3)	640,418	6	[M+H- H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
PE(14:1(9Z)/16:1)	660,453	0	[M+H] <sup>+</sup>

PE(13:0/16:0)	672,455	3	[M+Na]+
PA(16:0/17:0)	664,492	1	[M+H]+
PA(22:0/12:0)	677,515	0	[M+H]+
PE(16:0/14:0)	686,479	4	[M+H]+
PE(15:0/16:0)	700,491	2	[M+Na]+
PE-Cer(d16:2/20:1)	701,523	0	[M+H]+
PS(O-16:0/17:1)	716,542	0	[M+H- H <sub>2</sub> O]+
TG(16:0/16:0/16:0)	845,6799	23	[M+K]+
<b>Метаболиты (Режим отрицательных ионов)</b>	<b>m/z</b>	<b>Δppm</b>	<b>Аддукт</b>
Cer(d15:1/18:1)	566,478	2	[M+CH <sub>3</sub> COO]-
Cer(t18:0/16:0)	590,491	0	[M+Cl]-
DG(15:0/22:3/0:0)	653,510	4	[M+Na-2H]-
PC(12:0/15:0)	662,477	0	[M-H]-
PA(15:1/19:1)	671,453	19	[M-H]-
PE(15:0/16:0)	676,484/677,472	12	[M-H]-
PG(15:0/16:0)	689,486	15	[M-H <sub>2</sub> O-H]-
PE-Cer(17:1/15:0)	692,488	4	[M+F]-
PE(P-14/15:0)	692,488	0	[M+FA-H]-
PS(O-16:0/O-16:0)	706,554	21	[M-H]-
PE(15:0/18:3)	720,463	6	[M+Na-2H]-
PE(15:0/18:3)	735,481	6	[M+Na-2H]-
CL(20:3/20:3/18:2/18:2)	749,500	6	[M-2H]2-

В отличие от мембраны, структура ЛПС может сильно варьировать между патогенным и непатогенным штаммом. Для того, чтобы определить конкретную молекулярную структуру ЛПС двух штаммов, был использован метод экстракции с применением горячего тризола (Invitrogen, США) [113]. Как и в случае анализа фосфолипидов мембраны был использован метод прямого ввода образца в электроспрей, а съемка была произведена в режиме отрицательных ионов. В результате было определено 38 различных соединений, входящих в состав ЛПС (Таблица 5). Среди обнаруженных ионов, идентифицировали липид А-дисахарид-1-фосфат, 3-дезоксид-D-манно-октулозонил-липид IV (A), KDN $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -COP (D18: 1/24: 1 (15Z)) и многочисленные галактозилцерамиды и гликозилцерамиды (полисахаридные цепи, состоящий из 4-х до 8 углеродных единиц). Структура обнаруженного липида А-дисахарид-1-фосфата была такой же, как ранее описанного Elhenawy и соавт [3]. Как и следовало ожидать, наиболее представленные ионы в спектре принадлежали к классам цереброзидов, которые обычно характеризуют ЛПС *B.fragilis*. Полученные данные были

помещены в UCSD (Центр вычислительной масс-спектрометрии (Massive ID: MSV000080382))

**Таблица 5** Перечень идентифицированных липидов, полученных в ходе масс-спектрометрического анализа в режиме отрицательных ионов

Метаболит (Режим отрицательных ионов)	m/z	$\Delta$ ppm	Adduct
S-DGD-5-PA (1-O-[6-O-(2,3-di-O-phytanyl-1-phospho-sn-glycerol)-2-O-(2-HSO <sub>3</sub> -alpha-D-mannopyranosyl)-alpha-D-glucopyranosyl]-2,3-di-O-phytanyl-sn-glycerol)	1770.3878	17	[M-H] <sup>-</sup>
S-DGD-5-PA	1792.393	29	[M+Na-2H] <sup>-</sup>
3-HSO <sub>3</sub> -Gal-alpha1-6-Man-beta1-2-Glc-alpha1-1-[sn-2,3-di-O-phytanylglycerol]-6-[phospho-sn-2,3-di-O-phytanylglycerol]	2006.4487	0	[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>
Lipid IVA	1946.4822	28	[M-H] <sup>-</sup>
	1992.3818	24	[M+FA-H] <sup>-</sup>
	1385.8155	14	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>
3-Deoxy-D-manno-octulosonyl-lipid IV(A)	1623.8715	20	[M-H] <sup>-</sup>
Lipid A -disaccharide-1-P	1345.8289	24	[M+Na-2H] <sup>-</sup>
GalNAcalpha1-3GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/24:0)	1578.9478	28	[M+K-2H] <sup>-</sup>
BPG(C <sub>20</sub> ,C <sub>20</sub> ,C <sub>20</sub> ,C <sub>20</sub> ) изомер (sn-2,3-di-O-phytanyl-1-phosphoglycerol-3-phospho-sn-2,3-di-O-phytanylglycerol)	1520.2549	28	[M-H] <sup>-</sup>
CL(1'-[14:1(9Z)/14:1(9Z)],3'-[14:1(9Z)/15:1(10Z)])[rac]	1279.7775	18	[M+Cl] <sup>-</sup>
BPG(C <sub>25</sub> ,C <sub>20</sub> ,C <sub>20</sub> ,C <sub>20</sub> )	1572.3935	17	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>
KDNalpha2-3Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/24:1(15Z))	1650.3505	28	[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>
	1220.7617	22	[M-H] <sup>-</sup>
Galbeta1-3GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)	1280.7759	26	[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>
	1397.8087	4	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>
Galalpha1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/22:0)	1268.778	24	[M-H] <sup>-</sup>
GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/20:0)	1327.7937	12	[M+FA-H] <sup>-</sup>
Fucalpha1-2Galalpha1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/20:0)	1386.8113	18	[M-H] <sup>-</sup>
GalNAcbeta1-4(NeuAalpha2-3)Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/24:0)	1446.8242	23	[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>
	1504.8421	16	[M+K-2H] <sup>-</sup>
Fucalpha1-2Galbeta1-3GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/16:0)	1515.8397	1	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>
Galbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/20:0)	1286.8121	21	[M+FA-H] <sup>-</sup>
Galalpha1-3Galalpha1-3Galalpha1-4Galbeta1-	1328.7925	26	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>

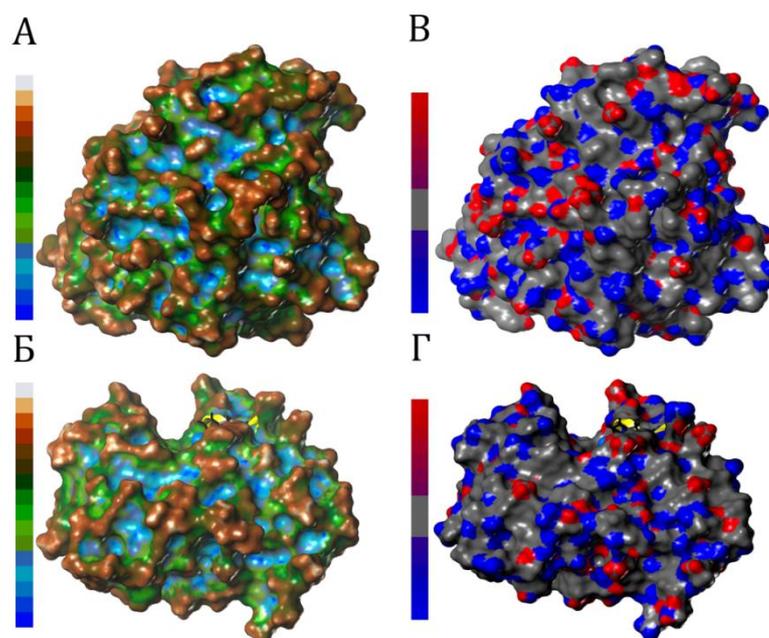
4Glcbeta-Cer(d18:1/16:0)			
GalNAcalpha1-3GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)	1368.7745	17	[M+Na-2H] <sup>-</sup>
	1456.8245	19	[M-H] <sup>-</sup>
alNAcbeta1-4(NeuGcalpha2-3)Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)	1398.8076	2	[M-H] <sup>-</sup>
NeuAcalpha2-3GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/22:0)	1622.8733	25	[M+Na-2H] <sup>-</sup>
Galbeta1-4(NeuAcalpha2-3)Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)	1379.7754	21	[M+K-2H] <sup>-</sup>
KDNalpha2-3Galbeta1-3GalNAcbeta1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)	1485.8083	15	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>
Fucalpha1-2Galalpha1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)	1404.8437	23	[M+FA-H] <sup>-</sup>
GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/20:0)	1319.7614	0	[M+K-2H] <sup>-</sup>
Galbeta1-3GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/16:0)	1387.8084	9	[M-H] <sup>-</sup>
M(IP)2C(t20:0/26:0(2OH))	1444.8281	12	[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>
NeuAcalpha2-3GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)	1544.8239	29	[M-H] <sup>-</sup>
GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/24:1(15Z))	1357.8236	7	[M+Na-2H] <sup>-</sup>
DGDG(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)[15(R)OH-18:2(9Z,12Z)])	1239.793	14	[M+Na-2H]
Fucalpha2-3GlcNAcbeta1-6GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/16:0)	1574.8559	15	[M-H] <sup>-</sup>
KDNalpha2-3Galbeta1-4(Fucalpha1-3)GlcNAcbeta1-3Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/16:0)	1603.8393	11	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>
Galalpha1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/24:0)	1334.8292	23	[M+K-2H] <sup>-</sup>
Fucalpha1-2Galalpha1-3Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/20:0)	1334.8292	23	[M+K-2H]
	1208.7637	20	[M-H] <sup>-</sup>
NeuAcalpha2-3Galbeta1-3GalNAcbeta1-4(NeuAcalpha2-8NeuGcalpha2-3)Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/26:0)	1127.0957	8	[M-2H] <sup>2-</sup>
Galalpha1-3Galalpha1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/18:0)	1374.8114	8	[M-H] <sup>-</sup>
Fucalpha1-2Galalpha1-3Galalpha1-4Galbeta1-4Glcbeta-Cer(d18:1/24:0)	1464.8589	15	[M+Na-2H] <sup>-</sup>

Таким образом, анализ структур мембран и ЛПС токсигенного и нетоксигенного штамма не выявил существенных отличий. Поэтому для дальнейших экспериментов было принято использовать наиболее представленные липиды мембраны клеток – фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин, а также основные компоненты структуры ЛПС, такие как липид А и полисахаридные

цепи из 4 и 8 основных сахаров. Так как механизм ассоциации токсина с мембранными структурами на сегодняшний день показан не был, было принято решение провести предварительное тестирование вариантов взаимодействия указанных структур и двух форм токсина посредством компьютерного моделирования.

### **3.7 Компьютерное моделирование процессов взаимодействия токсина со структурами мембраны везикулы**

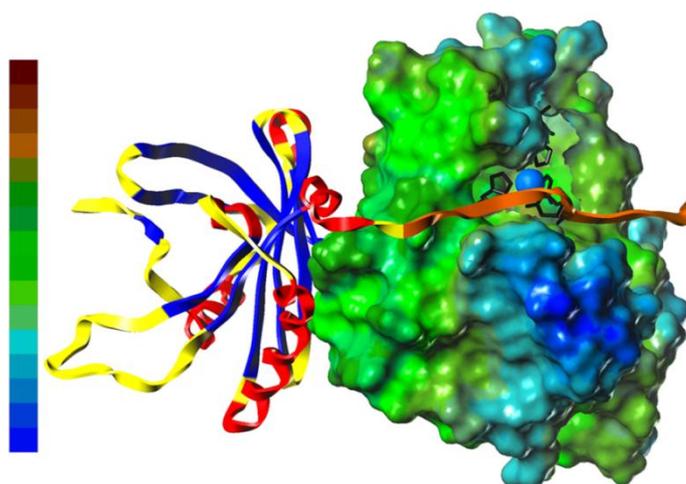
Для моделирования процессов взаимодействия токсина со структурами мембраны были выбраны в качестве мишени две формы токсина (pBFT2 и mBFT2). В качестве лигандов выступали два фосфолипида наиболее распространенных классов, представленных в мембране *B. fragilis* (PC - фосфатидилхолин и PE- фосфатидилэтаноламин) в соответствии с результатами липидного исследования, а также основные компоненты ЛПС (липид А и полисахаридные цепи 8 основного сахара (PSC)). Результаты моделирование поверхностей pBFT2 и mBFT2 в соответствии с распределением гидрофобного потенциала, полостей и потенциальных доноров и акцепторов, распределения водородных связей показаны на **рисунке 28**.



**Рисунок 28** Компьютерное моделирование поверхности зрелой (mBFT2) и непроцессированной (pBFT2) формы токсина согласно распределению потенциала гидрофобности поверхности (А, Б), а также расположению потенциальных доноров и акцепторов водородных связей (В,Г). (А,Б) - Поверхность Конолли mBFT2 и pBFT2 окрашена согласно распределению гидрофобного потенциала от минимального (серый цвет шкалы) до максимального (темно-синий)(SYBYL X1.2). (В,Г) - Поверхность Конолли mBFT2 и pBFT2 окрашена согласно распределению потенциальных доноров и акцепторов водородных связей, таким образом, что акцепторы окрашены в голубой цвет, а доноры в красный (SYBYL X1.2)

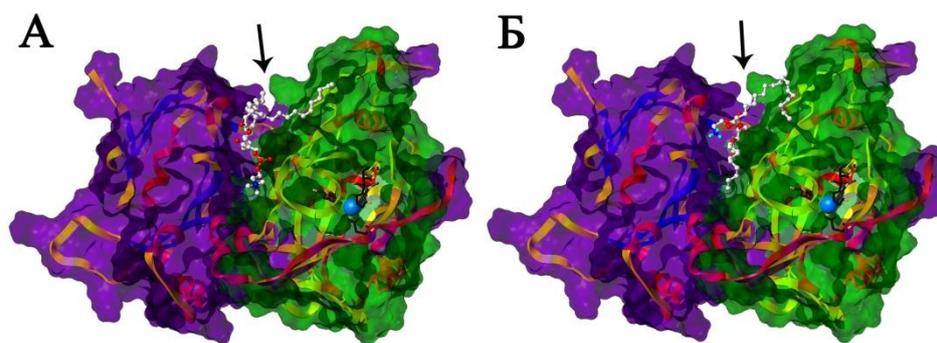
Согласно полученным данным поверхности обеих мишеней (mBFT2 и pBFT2) имеют равномерно распределенные области с высоким гидрофобным потенциалом, что является оптимальным для формирования белок-липидных взаимодействий. Кроме того, белки имеют несколько глубоких борозд с повышенным гидрофобным потенциалом. При этом, непроцессированная форма токсина характеризуется выраженной бороздой с высоким гидрофобным потенциалом, вероятно способствующей усилению энергии связывания с потенциальными липидными лигандами.

В ходе моделирования было показано, что продомен незрелой формы белка глубоко погружен в борозду, формирующую активный центр белка, таким образом, способствуя, вероятно, ингибированию протеолитических эффектов белка (Рисунок 29).



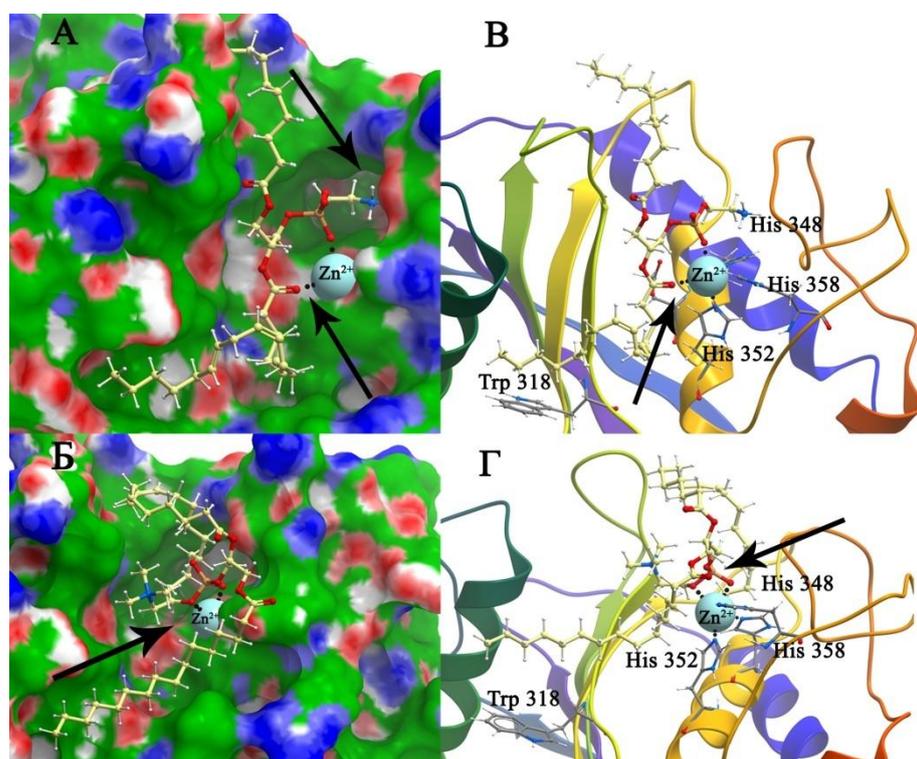
**Рисунок 29** Моделирование поверхности mBFT2 согласно распределению гидрофобного потенциала. Поверхность Конолли mBFT2 содержит фрагмент pBFT2, не покрытый поверхностью Конолли (фрагмент состоит из остатков аминокислот Pro187 - Val201 или  $\beta$ 13 цепь, окрашен в терракотовый цвет). Рендеринг фрагмента локализован в активном центре белка, в каталитическом домене, что способствует возникновению стерической помехи для потенциального взаимодействия токсина с субстратом. Атомы кислорода карбонильной группы  $\beta$ 13 фрагмента формируют координационные связи с ионом цинка в активном центре белка.

Так как вероятность связывания pBFT2 с наружными структурами мембраны низка, вследствие отсутствия непротессированной формы токсина на поверхности везикул согласно данным иммуно-блота, для моделирования процессов взаимодействия были выбраны наиболее вероятные кандидаты, такие как PE и PC, составляющие основу липидного бислоя мембраны. В результате, оба липида эффективно взаимодействуют с крупной бороздой, между двумя доменами белка, и способствуют, вероятно, первичной ассоциации незрелого токсина с внутренней частью цитоплазматической или внешней мембраны (**Рисунок 30**). Собственно подтверждением данного явления стало обнаружение методом иммуно-блота непротессированной формы токсина в составе мембранной фракции.

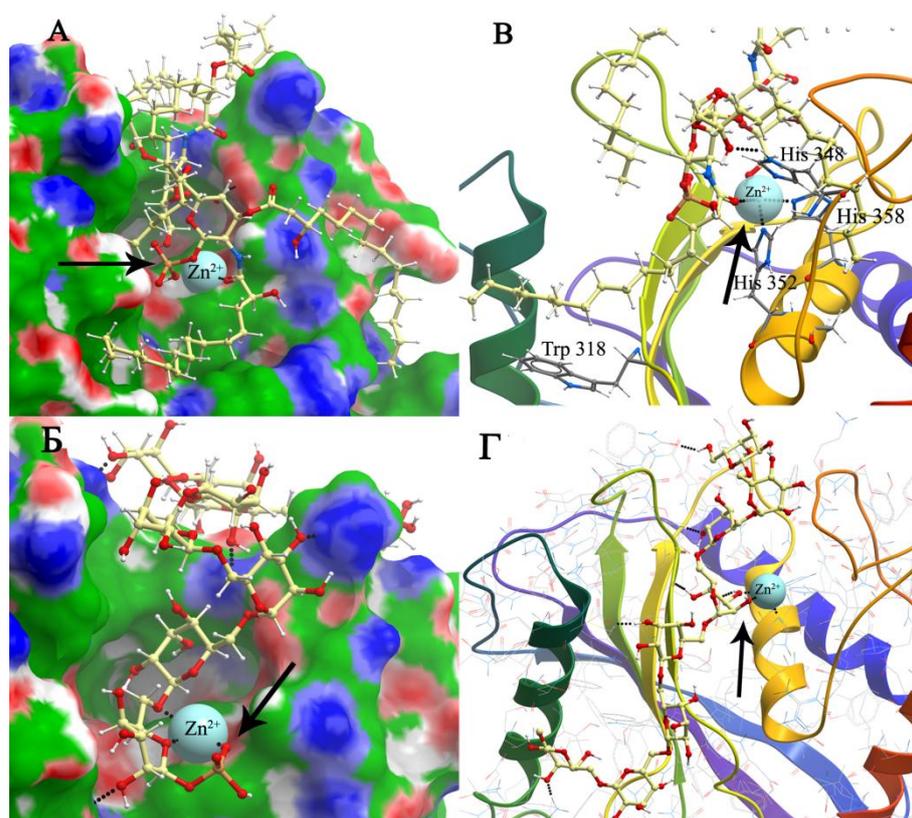


**Рисунок 30** Моделирование процесса взаимодействия незрелой формы токсина с липидами РС(А) и РЕ(Б). Указанные структуры выбраны с позиции наилучших значений энергий связывания согласно расчетным данным (ICM). Поверхность Конолли в обоих случаях окрашена согласно доменной структуре белка, так что домен рVFT2 окрашен в фиолетовый цвет, а домен mVFT2 – в зеленый. Рендеринг структуры mVFT2 окрашен согласно вторичной структуре, ион  $Zn^{2+}$  окрашен в голубой цвет. Аминокислоты, участвующие в формировании координационных связей окрашены в черный цвет. Атомы лигандов (РС и РЕ) окрашены таким образом, что атомы водорода имеют голубой цвет, атомы азота – темно-синий цвет, атомы кислорода – красный цвет, атомы фосфора – оранжевый, атомы углерода – белый.

Однако далее происходит процессинг белка с участием цистеиновой протеазы описанной ранее, и уже процессированная форма содержит еще одну крупную борозду, открывающую доступ к активному центру белка, содержащему ион  $Zn^{2+}$ . Данная форма белка, очевидно, может взаимодействовать как с липидами РЕ и РС, так и со структурами ЛПС. На **Рисунках 31** и **32** представлены все возможные варианты взаимодействия указанных лигандов и мишени с наиболее высокими значениями энергии взаимодействия (**Таблица 6**).



**Рисунок 31** Моделирование процессов взаимодействия зрелой формы белка с липидами PC (А) и PE (Б) Указанные структуры выбраны с позиции наилучших значений энергий связывания согласно расчетным данным (ICM). Поверхность Конолли mBFT2 окрашена согласно распределению гидрофобного потенциала (зеленый цвет) и распределению доноров (синий), акцепторов (красный). Атомы лигандов (PC и PE) окрашены таким образом, что атомы водорода имеют голубой цвет, атомы азота – темно-синий цвет, атомы кислорода – красный цвет, атомы фосфора – оранжевый, атомы углерода – белый. Ион  $Zn^{2+}$  окрашен в голубой цвет. Черные точки характеризуют наличие водородных связей. Кислороды фосфатных групп липидов, формирующие координационные связи с ионом  $Zn^{2+}$  окрашены в красный. Азотная группа PE формирует донорно-акцепторные связи с аминокислотами mBFT2 (указано стрелками). Детальная информация о формировании координационных связей указана на рисунке: для PC – В, для PE – Г.



**Рисунок 32** Моделирование процессов взаимодействия зрелой формы белка с липидом А (А) и полисахаридной цепью (Б) Указанные структуры выбраны с позиции наилучших значений энергий связывания согласно расчетным данным (ICM). Поверхность Конолли mBFT2 окрашена согласно распределению гидрофобного потенциала (зеленый цвет) и распределению доноров (синий), акцепторов (красный). Атомы лигандов (Липид А и полисахаридная цепь) окрашены таким образом, что атомы водорода имеют голубой цвет, атомы азота – темно-синий цвет, атомы кислорода – красный цвет, атомы фосфора – оранжевый, атомы углерода – белый. Ион  $Zn^{2+}$  окрашен в голубой цвет. Черные точки характеризуют наличие водородных связей. Кислороды фосфатных групп липидов, формирующие координационные связи с ионом  $Zn^{2+}$  окрашены в красный. Азотная группа РЕ формирует донорно-акцепторные связи с аминокислотами mBFT2 (указано стрелками). Детальная информация о формировании координационных связей указана на рисунке: для липида А – В, для полисахаридной цепи – Г.

Как видно из **таблицы 6**, гидрофобные взаимодействия вносят значительный вклад ( $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ ) в значение энергии связывания при образовании комплекса для обоих белков (mBFT2 и pBFT2). Кулоновский вклад ( $\Delta G_{\text{el}}$ ) в случае образования комплекса pBFT2 незначителен ( $\Delta G_{\text{el}}$  сравним с  $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ ) по сравнению с комплексным образованием mBFT2 при взаимодействии с ионом цинка. Кроме того, энергия связи компенсируется энтропией ( $T\Delta S$ ). Однако Кулоновский вклад компенсируется электростатической составляющей энергии сольватации ( $\Delta G_{\text{polar}}$ ). Таким образом, гидрофобные остатки жирных кислот липидов могут полностью укладываться в борозды обоих белков, образуя

опосредованную высокой энергией связывания ассоциацию липидов и белка. Кроме того, липиды могут образовывать водородные связи с аминокислотными остатками на поверхности борозды pBFT2 / mBFT2 (**Рисунок 32**)

Азотная группа PE имеет тенденцию к образованию донорно-акцепторных связей с аминокислотами, расположенными в полости mBFT2 (**на Рисунке 32** **указано стрелкой**).

Липид А, в качестве основного компонента ЛПС, также образует водородные связи с аминокислотными остатками в бороздке mBFT2 (**Рисунок 32**). 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 6**)

**Таблица 6** Расчетные энергии связывания для лигандов (PC-фосфатидилхолин, PE-фосфоэтаноламин, PSC – полисахаридная цепь, липид А) (ICM)

	Лиганды	$\Delta G_{bind}$ (Ккал /моль)	$\Delta G_{el}$ (Ккал /моль)	$\Delta G_{polar}$ (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
	Lipid A	-10,68	-9,80	15,20	-24,30	-8,22
	PSC с фосфатной группой	-8,94	-14,04	15,76	-16,68	-6,02
	PSC без фосфатной группой	-11,31	-9,97	9,60	-17,54	-6,60
pBFT2	PE	-7,78	-5,44	8,21	-16,97	-6,42
	PC	-6,90	3,15	2,91	-19,78	-6,82

В соответствии с Elhenawy и др., липидная молекула содержит фосфатную группу, но полисахарид (PSC) может существовать без фосфатной группы в водной среде[3]. PSC состоит из длинных цепей моносахаридных звеньев, связанных между собой гликозидными связями, которые образуют множество водородных связей с mBFT2 аминокислотами (**Рисунок 32**). Эти взаимодействия

могут оказать существенное влияние на образование комплекса полисахаридной цепи с mBFT2.

Но, 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 A и PSC и ионом цинка в активном центре mBFT2. Кроме того, атомы кислорода карбонильной группы PC и PE образуют связи с цинком. Согласно расчетным данным, электростатические вклады комплекса липид-mBFT2 выше, чем для комплекса липид-pBFT2, что вероятно указывает на формирование координационных связей

$$(\Delta G_{el} (PE + pBFT2); \Delta G_{el} (PC + pBFT2) < \Delta G_{el} (PE + mBFT2); \Delta G_{el} (PC + mBFT2))$$

Таким образом, результатом компьютерного моделирования стало формирование гипотезы о возможной ассоциации разных форм токсина с компонентами мембраны. В качестве предварительной версии была выдвинута следующая. pBFT2 взаимодействует с липидами цитоплазматической мембраны и накапливается на внутренней мембране. На этом этапе, в результате флуктуации липидного слоя, белок может попасть в периплазму, где подвергнется протеолизу с образованием активной формы токсина. Атомы кислорода липидных фосфатных групп, расположенных на внутренней поверхности бислоя наружной мембраны, взаимодействуют с активным центром mBFT2, одновременно образуя координационные связи с ионом цинка. Тепловое движение белка приводит к локальному растяжению липидов, что способствует прекращению гидрофобного взаимодействия. Остатки жирных кислот липидов занимают свободные борозды в mBFT2, что приводит к продвижению mBFT2 во внешнюю мембрану. В этот момент может произойти формирование везикулы с включением токсина в ее мембрану. Однако, несмотря на высказанное предположение, все вышеперечисленные гипотезы, построенные на результатах компьютерного моделирования, требуют подтверждения с применением методов физико-

химического анализа. Для этих целей в работе были использованы методы ЯМР и флуоресцентного тушения, а также ряд биологических экспериментов.

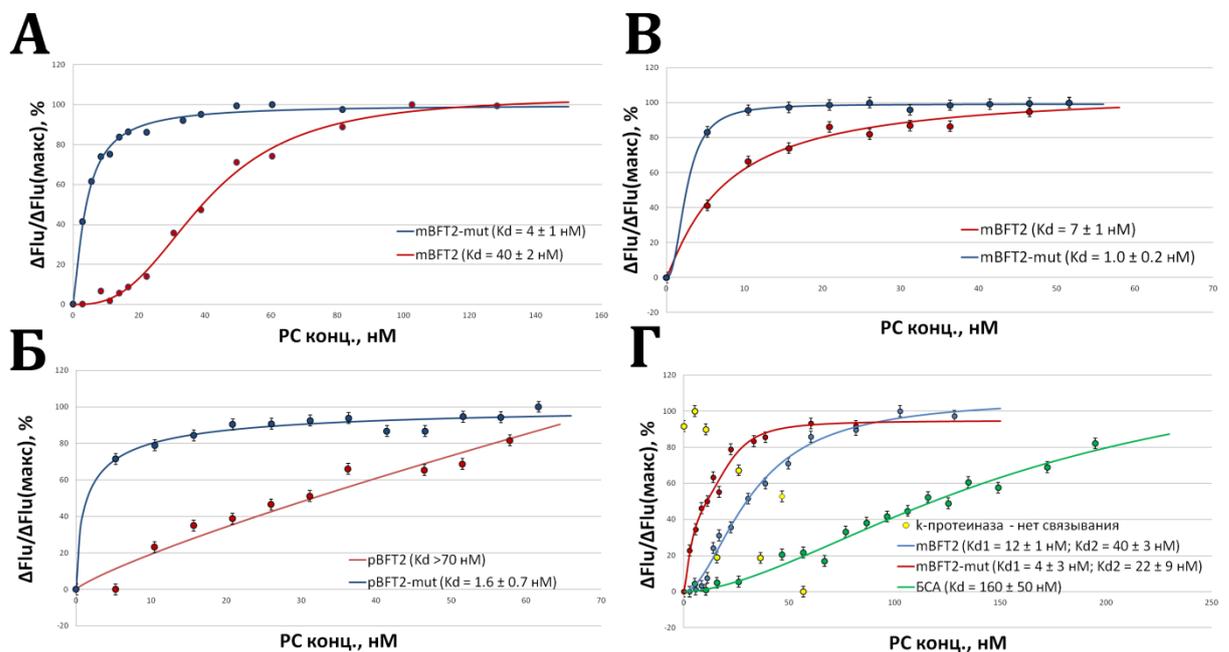
### **3.8 Физико-химические методы для подтверждения результатов компьютерного моделирования**

#### **3.8.1 Флуоресцентное тушение**

В приведенных экспериментах молекулярного моделирования и докинга, были выявлены наиболее вероятные классы липидов, взаимодействие с которыми может приводить к формированию белок-липидных комплексов. Именно фосфолипиды были выбраны нами для дальнейшего доказательства методами физико-химического анализа формирования белок-липидных комплексов.

Анализ тушения флуоресценции белка, на сегодняшний день является одним из популярных методов исследования липидно-белковых взаимодействий [141, 142]. Данный способ был выбран из-за присутствия 4 остатков триптофана, локализующихся в каталитическом центре белка. В ходе эксперимента в качестве контроля была использована белок-липидная пара, для которой показано отсутствие белок-липидных взаимодействий (Протеиназа К). При этом бычий сывороточный альбумин (БСА), напротив, был использован в качестве положительного контроля, связывающего липиды в среднем наномолярном диапазоне [143]. Характеристическая флуоресценция белка контролировалась в максимуме эмиссии  $T_{gr} / T_{ug}$  при длине волны 295 нм или 280 нм в присутствии повышающейся концентрации РС, организованного в липидные слои посредством обращенно-фазового выпаривания (**Рисунок 33**). 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. Важно отметить, что наличие более крупных агрегатов с различной стехиометрией при высоких концентрациях липидов не может быть исключено.

Так как в соответствии с данными моделирования белок-липидные комплексы могут формироваться, в том числе из-за наличия координационных связей между ионом цинка и карбонильными группами липидов, 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 взаимодействующий с ионом цинка. Несмотря на ожидаемые эффекты, 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 33**). Тот факт, что mBFT2-MUT связан с РС более эффективно, чем белок дикого типа доказывает противоположный ожидаемому эффект. Таким образом, существенного вклада в формирование белок-липидного комплекса формирующаяся координационная связь не вносит.



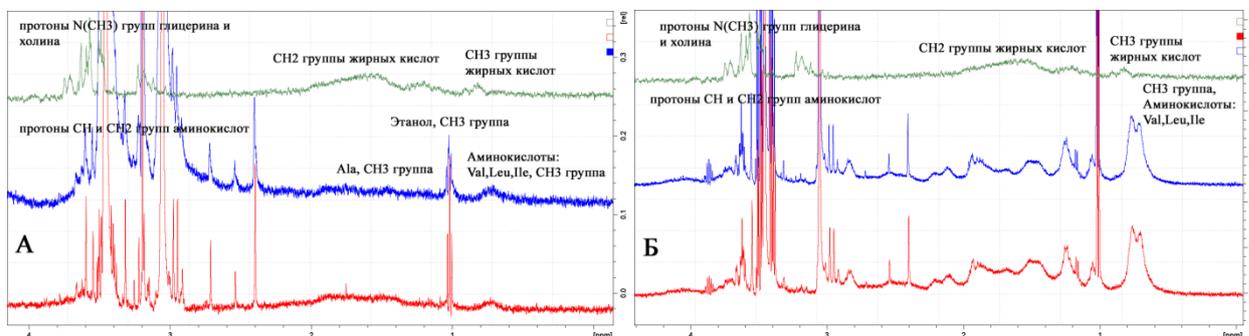
**Рисунок 33** Тушение флюоресценции белка в ходе формирования комплексов с липидными слоями, построенными из РС. Условия: стандартный фосфатно-солевой буфер (Б,В) или буфер, содержащий ионы  $Zn^{2+}$  (А,Г). Длина волны возбуждения – 295 нм(А,Б) или 280 нм(В,Г). Концентрация белка, взятая для эксперимента – 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).

### 3.8.2 ЯМР

Метод тушения флуоресценции продемонстрировал, что наиболее представленные липиды клеточной мембраны *B.fragilis* (РС и РЕ) образуют комплексы с mBFT2. Значения констант диссоциации (Kd), рассчитанные для РС-mBFT2 и РЕ-mBFT2 комплексов имели незначительные отличия и подтверждали факт взаимодействия белка и липида. Поэтому для определения химических групп липидов, непосредственно осуществляющих подобное взаимодействие, была использована ЯМР-спектроскопия.

Для изучения комплексообразования в ходе эксперимента были использованы 5 мкМ каждой формы BFT2 (pBFT2 и mBFT2) и 0.6 мкМ РС, формирующие мицеллы в водном растворе. Общий 1D спектр (WATERGATE) и 2D DOSY ЯМР-спектры были получены для РС, двух форм токсина и их смеси (**Рисунок 34**). Было показано, что РС формировал мицеллярную суспензию в водном растворе. Согласно результатам диффузионной ЯМР-спектроскопии, мицеллы состояли из довольно большого числа молекул (приблизительно 10 молекул на 1 мицеллу). Этот результат соответствует литературным данным [117]. Независимо были определены коэффициенты диффузии pBFT2 и mBFT2 в водных растворах ( $D_{pBFT2} = -8,4 \log (m^2 / c)$  и  $D_{mBFT2} = -8,9 \log (m^2 / c)$ ), соответственно. Коэффициент диффузии для РС в водном растворе составил  $D_{PC} = -8,2 \log (m^2 / c)$ . Далее было произведено измерение коэффициентов диффузии для смеси РС +pBFT2 ( $D_{PC-mix} = -9,1 \log (m^2 / c)$  и  $D_{pBFT2-mix} = -8,6 \log (m^2 / c)$ ) (**Рисунок 34**). Молекулы липидов были менее подвижными, чем в мицеллах, в растворе. Такая же ситуация наблюдалась для молекул токсина. Основным наблюдением стало изменение химических сдвигов, и ширины пиков для жирной кислоты РС в смеси. Пиковые изменения ширины в данном случае могли быть вызваны только изменением времени релаксации T2, т.е. снижением степени подвижности РС при формировании комплекса с белком и, соответственно, изменением конформации. Для каждой смеси, в которую входили либо mBFT2 и РС, либо pBFT2 и РС был зарегистрирован только один тип коэффициента диффузии, что указывало на наличие в растворе только одного комплекса в

каждом случае, без свободных молекул белка и липида. Различие между коэффициентами диффузии свободной молекулы pBFT2 и pBFT2 находящейся в комплексе с PC было небольшим. Следовательно, в ходе комплексообразования, вероятно, наблюдается лишь небольшое изменение конформации белка. Полученные результаты могут быть интерпретированы, как ассоциация мелких липидных частиц с белковыми молекулами. Результаты экспериментов ЯМР с mBFT2 были аналогичны описанным выше данным флюоресцентного тушения белка. mBFT2 также образует комплекс в смеси с PC. Однако молекулы mBFT2 самостоятельно формировали агрегаты, которые были выявлены согласно данным 2D DOSY. В случае с mBFT2 удалось рассчитать несколько коэффициентов диффузии в растворе:  $D_{\text{mBFT2}} = -8.9 \log(\text{м}^2 / \text{с})$  и  $D_{\text{mBFT2-агрегат}} = -9.3 \log(\text{м}^2 / \text{с})$ . При этом подвижность белка в комплексе с PC также была снижена. Коэффициенты диффузии PC и mBFT2 в смеси  $D_{\text{PC}} = -8,7 \log(\text{м}^2 / \text{с})$  и  $D_{\text{mBFT2-mix}} = -9 \log(\text{м}^2 / \text{с})$ , соответственно. Данные ЯМР были размещены в UCSD (Центр вычислительной масс-спектрометрии) (Massive ID: MSV000080385)



**Рисунок 34** ЯМР спектроскопия белково-липидных комплексов. ЯМР спектры отдельных молекул белков pBFT2(A) и mBFT2 (Б) окрашены синим. ЯМР спектры липидов окрашены в зеленый, комплексы белков и липидов в красный цвет.

Полученные в ходе компьютерного моделирования данные были подтверждены экспериментами по комплексообразованию с применением методики ЯМР и флюоресцентного тушения. Высокая тропность белка к липидам и структурам ЛПС объясняет механизм его проникновения в везикулу. Однако в ряде работ по изучению секреции таких токсинов как Vac и Cag было показано, что в ходе секреции, токсины оказываются в полости везикулы, полностью

защищенные от внешнего воздействия [70]. Такая локализация была доказана в ходе экспериментов по обработке везикул протеолитическими ферментами, например, протеиназой-К. Тогда токсины, локализующиеся в полости везикулы, сохраняли свою целостность, не разрушаясь под влиянием фермента. В данной работе была также исследована локализация токсина и оценена его биологическая активность в отношении описанного субстрата – E-кадгерина.

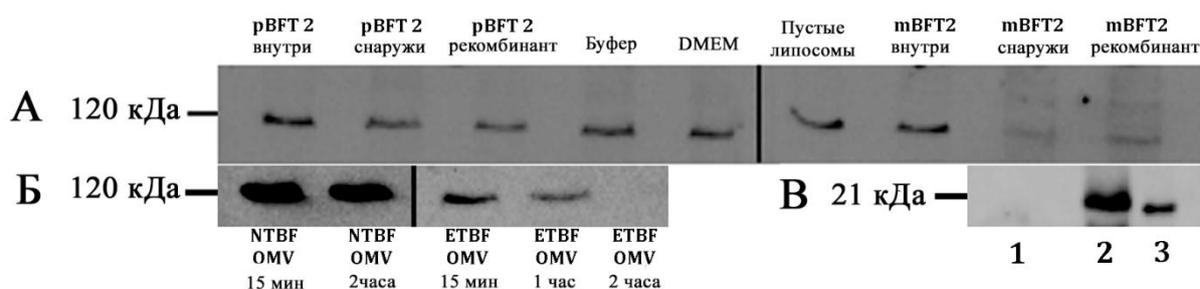
### **3.9 Биологические эксперименты для определения локализации токсина и его протеолитической активности**

В научной литературе на сегодняшний день описан лишь единственный субстрат протеолитической активности фрагилизина – белок межклеточного контакта – E-кадгерин. Однако оказывает ли токсин непосредственное влияние на данный субстрат или действует опосредованно через систему рецепторов, на сегодняшний день установить не удалось. Так в работе Kharlampieva и соавторов было показано отсутствие непосредственного эффекта токсина на рекомбинантную и выделенную из культуры NT-29 форму E-кадгерина [18]. Однако при обработке культуры NT-29 разными дозами токсина, была выявлена протеолитическая деградация данного белка, с изменением морфологии клеток. Данный, хоть и непрямой эффект протеолитической деградации E-кадгерина был использован в настоящей работе, как индикатор токсического действия токсин-содержащих везикул на культуру клеток NT-29. Кроме того, для установления точной локализации токсина были созданы искусственные, состоящие из РС липосомы, в которые токсин был добавлен как вне, так и включен в состав липосом.

#### **3.9.1 Времязависимая протеолитическая деградация E-кадгерина**

E-кадгерин является трансмембранным белком, основной домен которого имеет массу 120 кДа. Учитывая тот факт, что он деградирует под влиянием токсина, а в настоящей работе уже было показано присутствие токсина в составе везикул, был проведен эксперимент по обработке культуры NT-29 везикулами, выделенными у ETBF в течение определенных временных промежутков. Для контроля были взяты везикулы NTBF, не содержащие токсина, а также

рекомбинантная форма токсина, эффект которой на E-кадгерин уже был продемонстрирован ранее. С помощью Вестерн-блот анализа (**Рисунок 35 Б**) была продемонстрирована деградации 120 кДа субъединицы E-кадгерина в зависимости от времени инкубации культуры НТ-29 с везикулами и его полное расщепление через 2 часа после обработки культуры клеток везикулами ЕТВФ.



**Рисунок 35** Биологические эффекты токсина в составе везикул по отношению к E-кадгерину в культуре НТ-29. Для оценки степени деградации E-кадгерина использованы антитела против E-кадгерина. (А) Биологические эффекты токсина по отношению к E-кадгерину зависят от его локализации относительно поверхности везикулы. Инкапсулированные в липосомы (pBFT2 внутри и mBFT2 внутри) или добавленные к готовым липосомам - (pBFT2 снаружи и mBFT2 снаружи) белки были инкубированы с клетками линии НТ-29. Буфер (фосфатносолевой), DMEM (культуральная среда), пустые липосомы (не содержащие белка) (Б) Биологическое действие токсина, ассоциированного с везикулами по отношению к E-кадгерину, зависит от времени. 50 мкг общего белка ЕТВФ OMV и NTBF OMV добавили в культуральную среду НТ-29 линии на 15 мин, 1 час и 2 часа. (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

Важно отметить, что деградация E-кадгерина не происходила в случае инкубации культуры НТ-29 с NTBF везикулами. Таким образом, в ходе данного эксперимента удалось продемонстрировать основной уже ранее показанный биологический эффект токсина, ассоциированного с везикулами. Однако учитывая, что токсин не оказывает непосредственного протеолитического эффекта на E-кадгерин, но его рекомбинантная форма способствует деградации данного белка, вероятно BFT2 может иметь поверхностную локализацию по отношению к везикуле. Другой гипотезой опосредованного влияния на субстрат является интернализация везикулы, содержащей токсин в клетки линии НТ-29, с последующим выходом токсина и запуском внутриклеточного каскада в конечном

итоге с деградацией E-кадгерина. Однако в работе Wie и соавторов было отмечено наличие специфического рецептора, с которым вероятно и взаимодействует токсин [144]. По этой причине было принято решение провести ряд экспериментов по установлению точной локализации токсина, способствующей сохранению его протеолитической активности в отношении субстрата.

### 3.9.2 Опосредованная локализацией токсина деградация E-кадгерина

Для определения точной локализации токсина относительно поверхности везикулы было сделано несколько экспериментов с применением липосом (**Рисунок 35 А**). В первом случае полученные методом обращенной фазы липосомы были смешаны независимо с двумя формами токсина. После добавления белка к липосомам отдельно была исследована среда на предмет несвязавшего с поверхностью липосом токсина. Было показано, что в среде не определяется свободный токсин. Он локализован в составе комплекса с липосомами (**Рисунок 35 В**). В другом случае обе формы токсина независимо были включены в состав липосомы, т.е. локализовались в ее полости. Однако существовала возможность неполного включения всего количества токсина в полость липосомы, поэтому готовый препарат липосом с включенным в полость токсином был обработан протеиназой-К для удаления не включенного белка. Результат был исследован посредством Вестерн-блота (**Рисунок 35 В**). Таким образом, два типа липосом с mBFT2 и pBFT2 использовались для совместной инкубации с культурой клеток HT-29 для изучения влияния локализации токсина на степень деградации E-кадгерина.

В результате в ходе данных экспериментов была показана полная деградация E-кадгерина в клетках HT-29 после 2 часов обработки липосомами с добавленным mBFT2 (**Рисунок 35 А**). Тот же самый эффект был показан с использованием mBFT2 без липосом. Однако когда токсин был включен в состав липосом, не удалось выявить расщепления E-кадгерина. Как и следовало ожидать, никакого эффекта на целостность E-кадгерина не оказали и препараты липосом,

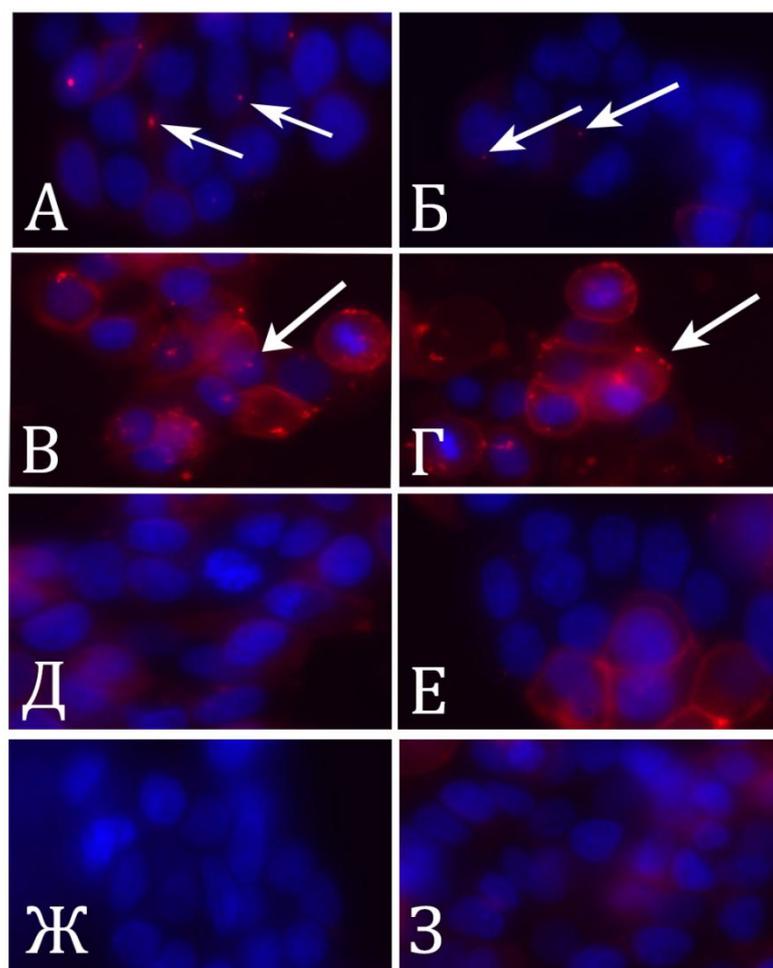
содержащие рBFT2, который был либо добавлен снаружи, либо включен внутрь липосом.

Таким образом, в ходе данных экспериментов удалось показать два явления. Во-первых, активная форма токсина ассоциирована с мембраной везикулы таким образом, что активный центр белка экспонирован наружу везикулы, так как не наблюдалось деградации субстрата при включении токсина в состав липосомы. Во-вторых, если токсин действует опосредованно, то согласно полученным данным его основное влияние может быть связано с взаимодействием с потенциальным рецептором на поверхности клеток, как уже было описано ранее для изолированного токсина [105]. Тогда будучи локализованным на поверхности везикулы он сможет с легкостью взаимодействовать с потенциальным рецептором, что и запустит каскад событий в конечном итоге приводящим к деградации E-кадгерина.

### **3.9.3 Флюоресцентная микроскопия препарата везикул и токсин-содержащих липосом**

Известно, что везикулы являются один из способов доставки веществ до клеток-мишеней. В случае с везикулами *B.fragilis* данное явление было продемонстрировано не только в ранее описанных экспериментах в нашей работе, но и ранее описано в литературе для NTBF. Для визуальной оценки распределения везикул, содержащих токсин на поверхности клеток NT-29, была использована флюоресцентная микроскопия. 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 NT-29. В качестве контроля использовали свободные DiI-меченые липосомы. Более того, чтобы уменьшить риски возможных ложноположительных результатов, связанных с высокой тропностью данного красителя к липидам мембран клеток, 10 мкл исходного раствора красителя было подвергнуто такому же протоколу изоляции и очистки, что и везикулы и липосомы. Полученный раствор, содержащий незначительное количество

красителя, которое осталось после описанной подготовки, было также использовано для инкубации с НТ-29 клетками. В соответствии с предыдущими результатами, mBFT2 и pBFT2 добавленные к приготовленным липосомам, формировали комплексы в растворе. В эксперименте с клеточной культурой, данные комплексы фиксировались на поверхности клеток (**Рисунок 36**).



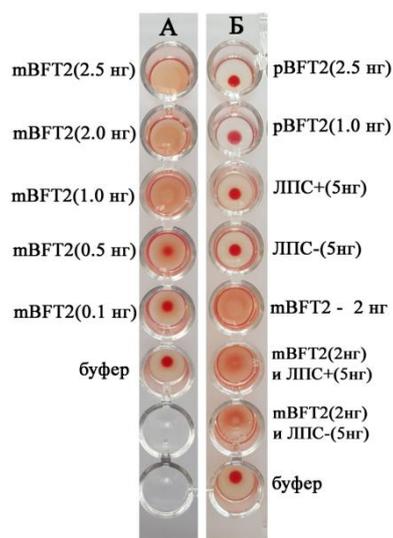
**Рисунок 36** Флюоресцентная микроскопия комплексов 3 мкг везикул, изолированных у ETBF - (А), и NTBF - (Б); 12 нМ pBFT2- (В), и 14,2 нМ mBFT2- (Г), добавляли к 100 мкл приготовленных липосом; 14,2 нМ mBFT2- (Д) и 12 нМ pBFT2- (Е), были инкапсулированы в липосомы. (Ж) - 10 мкл VybrantDiI добавляли в 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 НТ-29 в течение 1 часа. Ядра окрашивали DAPI (синий). Стрелки указывают на формирование белково-липидных комплексов, расположенных на поверхности клеток.

Кроме того, окрашенные везикулы ETBF и NTBF также располагались на поверхности клеток, что подтверждает в случае токсигенного штамма факт

доставки токсин-содержащих везикул до клеток мишеней. В результате сравнительного анализа препаратов клеток, обработанных мечеными ETBF и NTBF везикулами, удалось выявить меньшее количество фиксированных на поверхности клеток везикул нетоксигенного штамма. Данный факт указывает на возможное взаимодействие токсина с поверхностным рецептором, что значительно облегчает фиксацию везикулы с поверхностью клетки. Важно отметить, что контрольные образцы, содержащие меченые липосомы или липосомы с инкупсулированным белком не продемонстрировали наличия значимого количества поверхностно локализованных комплексов.

#### 3.9.4 Тест на геммаглютинацию

Ранее для везикул *B.fragilis* была показана геммаглютинация, при этом данный эффект никак не приписывали токсину. Независимо от везикулы, рекомбинантные формы токсина были использованы для анализа геммаглютинирующей способности. Кроме того, ранее в экспериментах было показано, что pBFT2 и mBFT2 имеют тенденцию к образовыванию водородных и координационных связей с мембранными компонентами, что может опосредовать изменение данной активности. В первом случае была исследована способность mBFT2 к геммаглютинации с увеличением концентрации (0,1 мкг-2,5 мкг) Таким образом, геммаглютинация при воздействии mBFT2 на эритроциты крови человека наблюдалась при концентрациях от 2 до 2,5 мкг (**Рисунок 37**).



**Рисунок 37** Тесты на геммаглютинацию. Геммаглютинирующая активность mBFT2 зависит от концентрации токсина(А). гемагглютинирующая активность mBFT2 и rBFT2 в присутствии

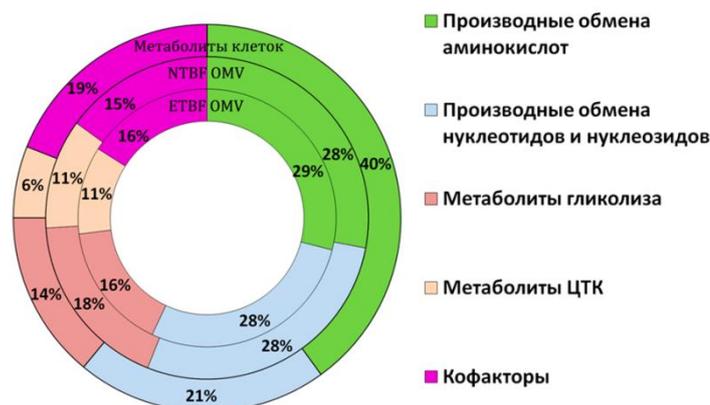
При этом rBFT2 не демонстрировал гемагглютинационной активности. Ингибировать геммаглютинирующую активность можно при добавлении ЛПС, выделенного из мембраны ETBF, что и было сделано. Так при предварительной инкубации mBFT2 с ЛПС было показано отсутствие геммаглютинирующего эффекта (**Рисунок 36**). Данный эксперимент явился дополнительным в ряду уже продемонстрированных, подтвердив поверхностную ассоциацию токсина с везикулой.

### 3.10 Сравнительное метаболомное исследование везикул

Основываясь на полученных протеомных данных, а также результатах исследования взаимодействия токсина с поверхностью везикулы были сделаны предположения о том, что данный вид транспорта может является необходимым звеном патогенеза воспалительных заболеваний ЖКТ вызванных токсигенным *B.fragilis*. Для нетоксигенного штамма было подтверждено ранее описанное явление наличия значительного количества ферментов, обуславливающих пищеварительную функцию. Однако обилие ферментов, обнаруженных в везикулах токсигенного штамма, вовлеченных в различные метаболические каскады позволило предположить, что биохимические процессы могут происходить далеко за пределами клеток, способствуя стабильности и

длительному функционированию независимых биологических систем – везикул. Ранее в литературе еще ни разу не возникало подобного предположения, скорее данные структуры рассматривались, как способ выведения продуктов деградации за пределы бактериальной клетки. Однако наличие ферментов для гидролиза сахаров у нетоксигенного штамма уже свидетельствует о том, что данная функция, способствующая ферментации полисахаридов клеточной поверхности отнесена за пределы клетки. Это может означать наличие независимой системы длительного функционирования везикул. Когда же речь идет о токсигенном штамме с обилием ферментов, в том числе способствующих защите от окислительного стресса, а также с наличием плотно ассоциированного токсина на поверхности везикулы, возникает предположение, что данные структуры имеют активные метаболические каскады, позволяющие сохранить на долгое время устойчивость системы. В этой связи впервые было принято решение исследовать метаболом везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов с целью подтверждения или опровержения высказанной гипотезы.

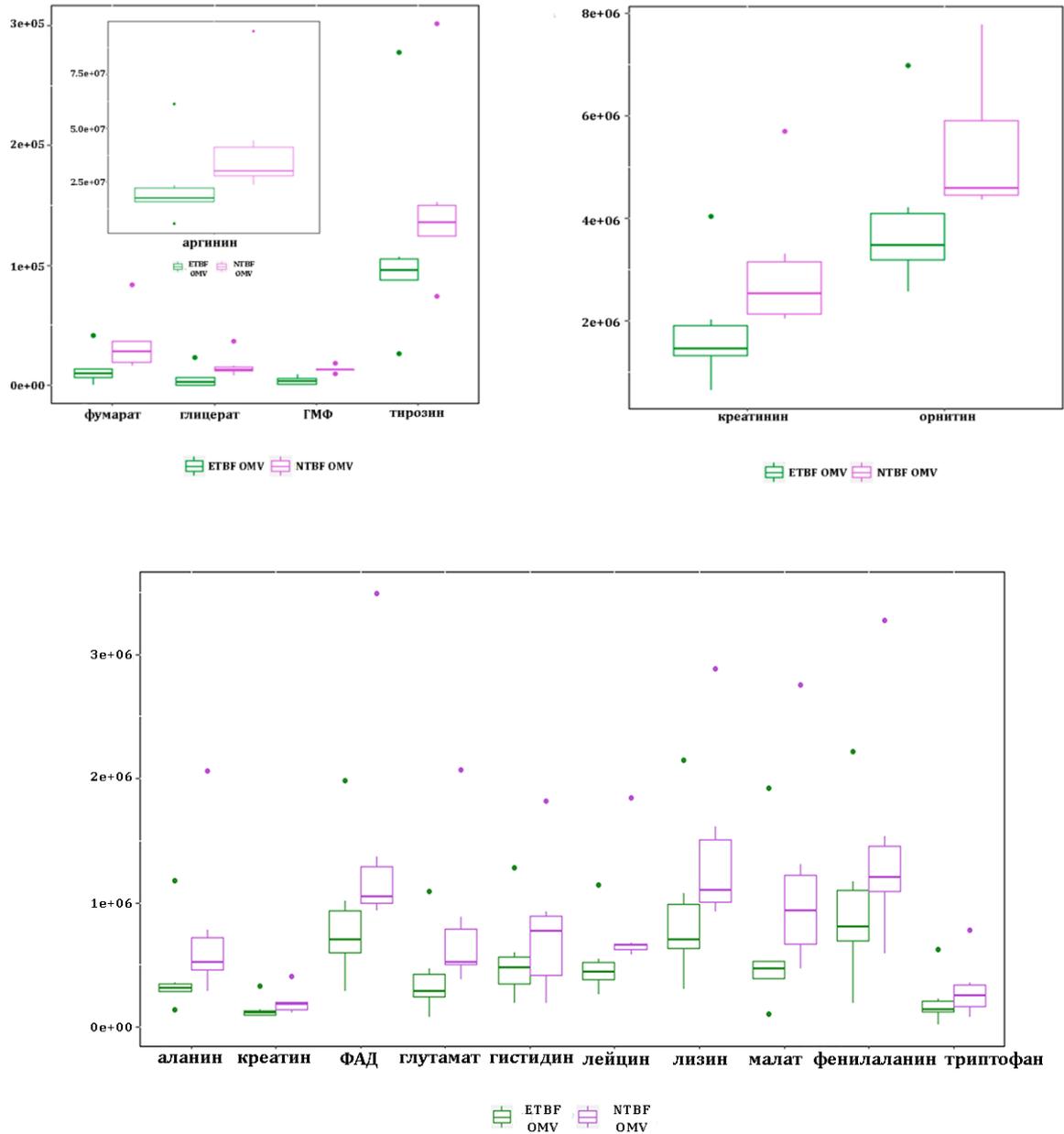
Для анализа метаболома были выбраны наиболее представленные метаболиты клеток, прежде всего вовлеченные в метаболические каскады, ферменты которых были обнаружены в везикулах. Используя стандарты метаболитов, было проведено ВЭЖХ-МС / МС исследование 95 метаболитов, которые высоко представлены в бактериальных клетках (**Приложение 8.7**). Полученные данные были дополнены посредством анализа ГХ-МС (**Приложение 8.8**)).



**Рисунок 38** Качественный анализ метаболитов, идентифицированных в клетках (внешняя диаграмма), в везикулах ETBF (средняя диаграмма) и в везикулах NTBF (внутренняя диаграмма) Метаболиты, участвующие в некоторых метаболических путях представлены в процентах, от общего числа выявленных в ETBF OMVs / клетки и NTBF OMVs / клетки метаболитов

В результате, в везикулах в равной степени были обнаружены компоненты метаболизма аминокислот, нуклеозидов, нуклеотидов, гликолиза, Цикла трикарбоновых кислот и несколько кофакторов (**Рисунок 39**). Как и в случае протеомного исследования, анализ метаболитов был проведен не только для везикул обоих штаммов, но и для клеток. В дополнении к данным, полученным посредством ВЭЖХ-МС/МС, результаты ГХ-МС, позволили выявить окисленные и восстановленные формы свободных жирных кислот (**Приложение 8.7**).

Сравнительное количественное метаболомное исследование (**Рисунок 39**) показало уменьшение количества метаболитов в ETBF везикулах по сравнению NTBF, что указывает на существование активных метаболических путей. Так было выявлено порядка 6 аминокислот, количество которых было увеличено в везикулах нетоксигенного штамма. Количество креатинина и креатина, глицерат-2-фосфата, компонентов цикла трикарбоновых кислот (фумарат и малат), кофакторов ФАД и ГМФ было увеличено в везикулах нетоксигенного штамма. (**Таблица 7**)



**Рисунок 39** Количественный метаболомный анализ метаболитов, идентифицированных в везикулах. Функция Box plot позволяет оценить разницу в количестве отдельных метаболитов, представленных в везикулах ETBF и NTBF

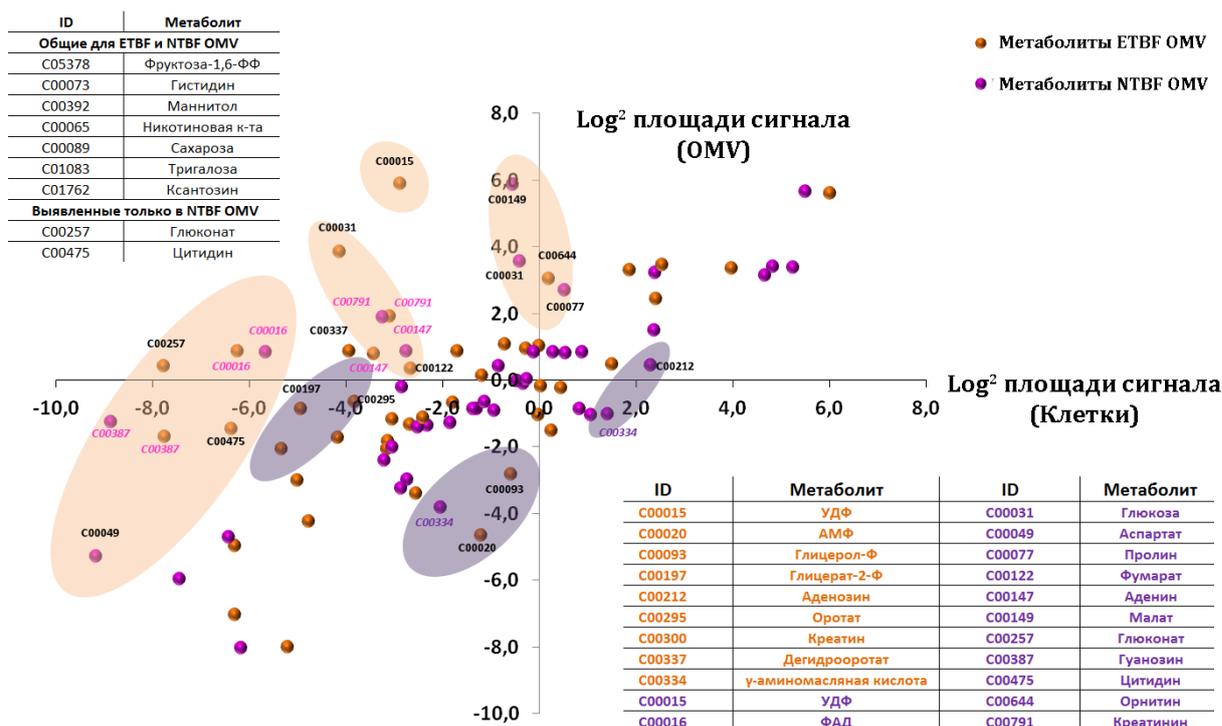
**Таблица 7** Результаты количественного анализа метаболитов ETBF и NTBF

ID	Метаболит	(NTBF/ETBF)	Время выхода	P-value	Q-value
C00082	L-Тирозин	1.3	6.491988	0.001294	0.032347
C00047	L-Лизин	1.6	4.06667	0.009666	0.120819
C00123	L-Лейцин/L-Изолейцин	1.6	3.375899	0.019762	0.141159
C00078	L-Триптофан	1.5	3.166178	0.024922	0.10384
C00079	L-Фенилаланин	1.5	3.038711	0.028793	0.102833
C00183	L-Валин	1.7	2.887239	0.034297	0.107178

C00025	L-Глутамат	2.0	2.799374	0.038022	0.111829
C00135	L-Гистидин	1.4	2.692345	0.043177	0.119937
C00041	L-Аланин	1.8	2.543114	0.050697	0.129244
C00077	L-Орнитин	1.3	3.232747	0.023135	0.115675
C00062	L-Аргинин	1.8	4.00147	0.010308	0.103084
C00197	D-Глицерат-2-Ф	2.8	8.069242	0.000473	0.023669
C00122	Фумарат	2.6	3.373054	0.019824	0.123898
C00149	Малат	1.8	3.182635	0.024466	0.111209
C00016	ФАД	1.7	2.887239	0.034297	0.114324
C00144	ГМФ	3.6	4.204983	0.008449	0.140815
C00791	Креатинин	1.7	3.611015	0.015364	0.128033
C00300	Креатин	1.4	3.046563	0.028536	0.109754

Было выявлено накопление D-глицерат-2-Р в NTBF везикулах, что указывает на наличие гликолиза и частичную активность этого пути в NTBF везикулах. Обнаруженное снижение промежуточных продуктов ЦТК и специфического кофактора ФАД может быть результатом активности цикла в ETBF везикулах. Увеличение ГМФ обнаруженное в NTBF везикулах может быть результатом процесса деградации РНК с последующим катаболизмом пуриновых нуклеотидов, что подтверждается специфической ферментативной активностью в них.

Везикулы характеризуются определенным набором белков, согласно протеомному профилированию. Следовательно, должны быть определены метаболиты, отражающие ферментативную активность везикул. Для доказательства данного явления было проведено сравнение относительной представленности метаболитов в клетках и везикулах. Методом корреляционного анализа данные были сравнены между собой. Как и ожидалось, отмечалась слабая корреляция между выявленными метаболитами клеток и везикул, в большей степени для токсигенного штамма, что может свидетельствовать о том, что в везикулах протекают активные метаболические реакции (**Рисунок 40**).

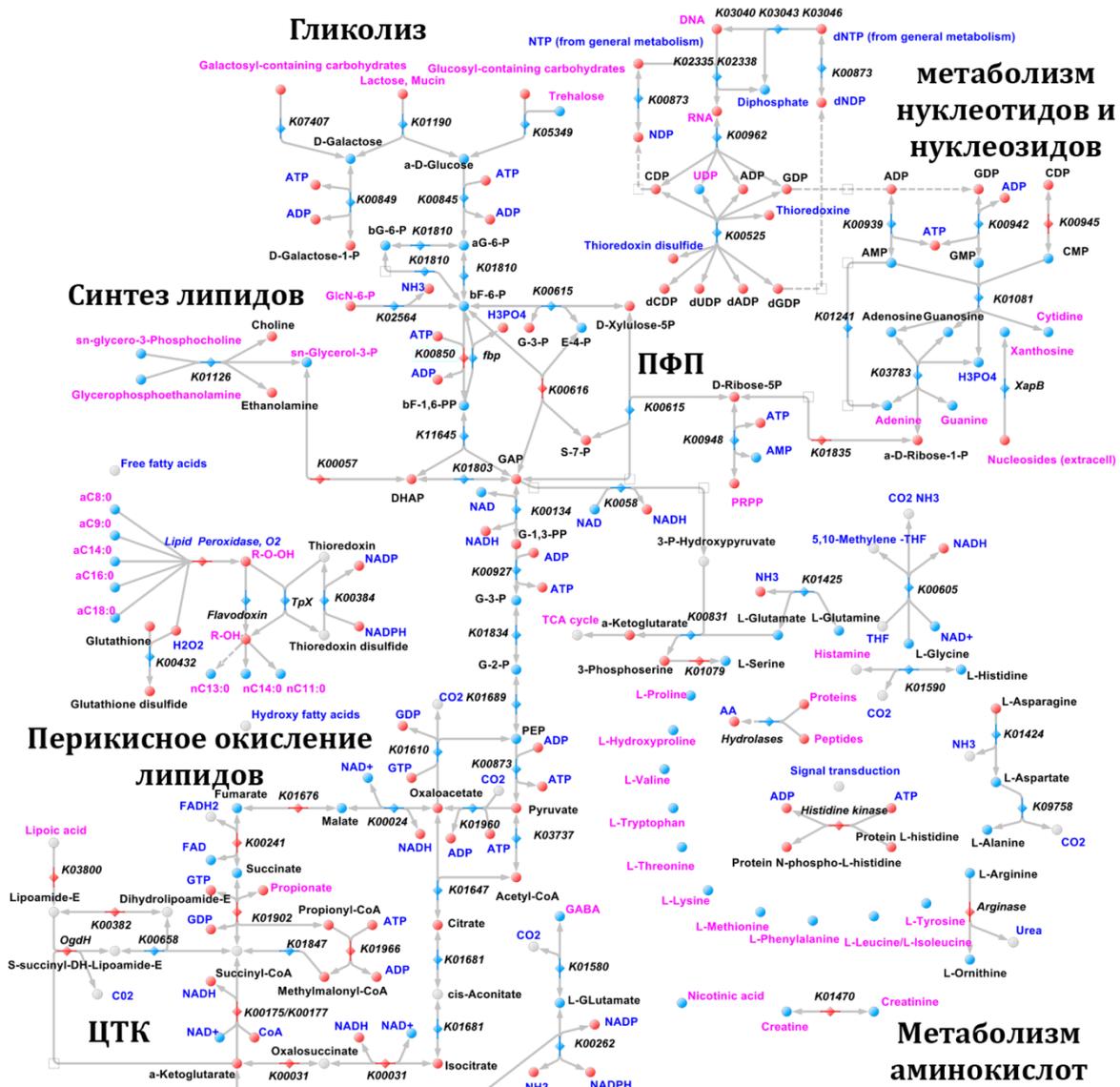


**Рисунок 40** Сравнительный корреляционный анализ относительной представленности метаболитов в клетках и в везикулах. Метаболиты, идентифицированные в везикулах ETBF, обозначены оранжевым цветом, в везикулах NTBF, обозначены розовым. Координаты каждой окружности указывают среднее значение логарифмической площади пика, вычисленной для метаболитов, определенных в везикулах, и в клетках, соответственно. Метаболиты, широко представленные в ETBF OMV, по сравнению с клетками ETBF, заключены в розовые эллипсы. Метаболиты широко представленные в NTBF OMV, по сравнению с NTBF клетками, заключены в фиолетовые эллипсы. Таблица, расположенная в верхнем левом углу содержит метаболиты, которые были обнаружены только в везикулах. Таблица в правом нижнем углу содержит расшифровку метаболитов согласно номенклатуре KEGG. Полные данные, представлены в (Приложении 8.9)

Среди исследованных метаболитов были не обнаруженные в клетках, но выявленные в везикулах компоненты различных биохимических каскадов: L-гистидин, маннитол, никотиновая кислота, сахароза, ксантозин, D-фруктоза-1,6-PP, и трегалоза. Были также выявлены уникальные метаболиты, представленные исключительно в везикулах NTBF: цитидин и глюконат. По сравнению с метаболитами, определенными в везикулах, клетки характеризовались схожими профилями метаболома, но несколько соединений были обнаружены исключительно в ETBF клетках (Приложении 8.9).

### 3.11 Реконструкция метаболических реакций, протекающих в обоих штаммах

Оценивая совокупно все полученные протеомные и метаболомные данные, были построены комплексные метаболические сети, потенциально активные в везикулах обоих штаммов. Кроме указанных данных для получения полной реконструкции были использованы данные протеогеномной аннотации, а также предсказаны согласно указанной методике потенциальные ферменты. 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 41-42**).



**Рисунок 41** 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.



реконструкции мы определили наиболее важные ферменты, участвующие в лимитирующей стадии ЦТК (синтез цитрата): цитрат-синтаза, малатдегидрогеназа и аконитатгидратаза. Наличие данных ферментов и метаболитов ЦТК, а также гликолиза, указывает на выработку активной энергии в везикулах. Также были выявлены ферменты метаболизма нуклеотидов и нуклеозидов, в том числе полинуклеотидфосфорилазы, 5'-нуклеотидазы и НДФ-редуктазы. Тем не менее, среди метаболитов, участвующих в указанных биохимических реакциях, катализируемых идентифицированными ферментами, был детектирован только УДФ. Среди метаболитом пиримидинового и пуринового циклов были идентифицированы несколько нуклеотид-монофосфатов.

На основании полученных протеоеномных данных, а также данных метаболомного анализа были реконструированы реакции перекисного окисления липидов в везикулах токсигенного штамма, включая перекисное окисление глутатиона, а также окислительно-восстановительные реакции с участием тиоредоксина. Подтверждением активности процессов перекисного окисления липидов стало обнаружение гидроксильных производных жирных кислот

Несмотря на обнаружение всех 20 аминокислот в обоих типах везикул, выявить ферменты, участвующие в их метаболизме не удалось, за исключением ряда трансфераз. Так был идентифицирован фермент, катализирующий декарбоксилирование гистидина до гистамина. Гистамин является не только хорошо изученным промежуточным метаболитом обмена гистидина, но и нейромедиатором, а также активным участником местных иммунных реакций [145, 146]. Особенностью метаболомного профиля ЕТВФ везикул стало обнаружение еще одного нейромедиатора -  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК), а также промежуточных продуктов ее биосинтеза –  $\alpha$ -кетоглутарата и глутамата. ГАМК является основным тормозным нейромедиатором в центральной нервной системе млекопитающих. Обнаруженные компоненты биосинтеза ГАМК в ЕТВФ везикулах, указывают на роль последних при непосредственном взаимодействии микробиоты и организма хозяина посредством модулирования

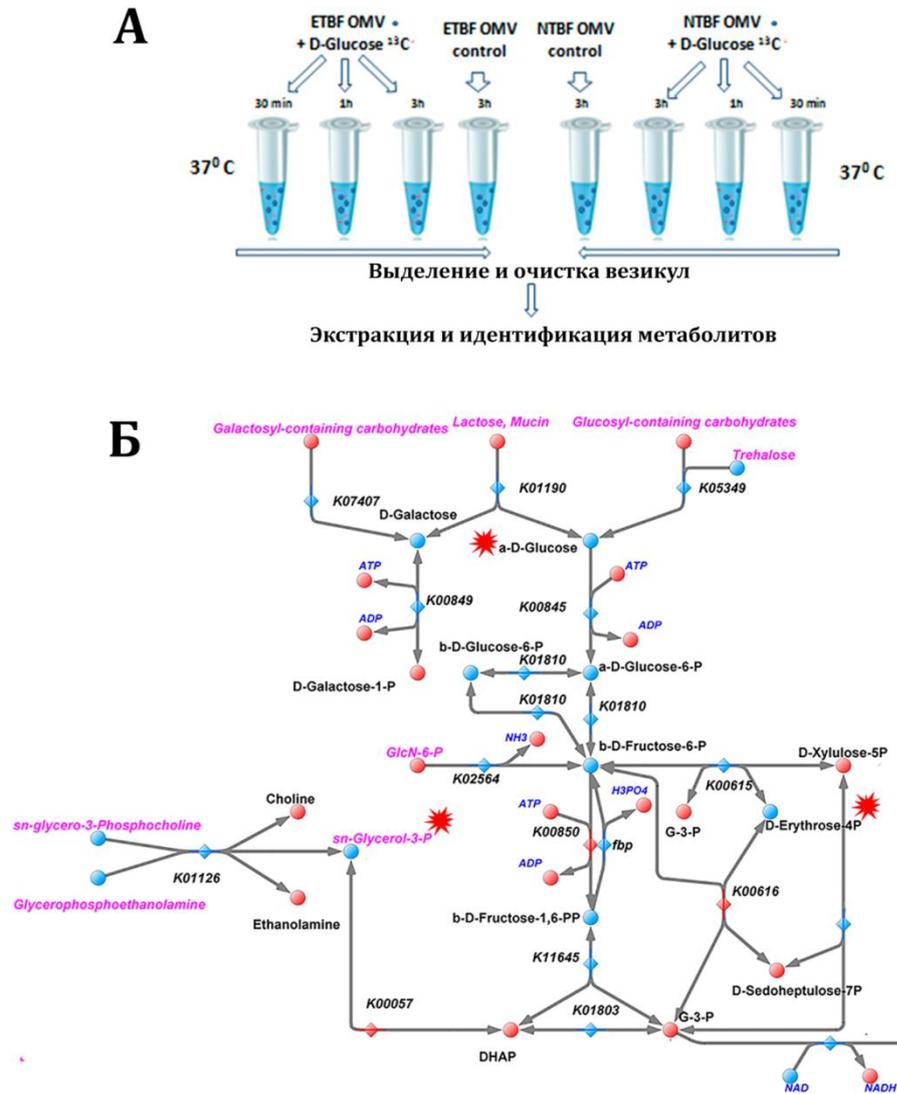
нейрофизиологических реакций и иммунологического ответа. Важно отметить, что для гистамина роль в обеспечении коммуникаций между бактериями и организмом человека, уже описана [147].

В сравнении с ETVF метаболом и протеомом везикул NTBF не включал компоненты основных путей. В везикулах NTBF были обнаружены аминокислоты, монофосфо-нуклеотиды и продукты их деградации. В ходе заполнения биохимических каскадов согласно полученным протеомным и метаболомным данным были зафиксированы “пробелы” идентификации, т.е. отсутствие в результатах протеомного анализа ферментов, метаболическая активность которых вероятна, в виду наличия соответствующего метаболита – участника биохимической реакции. Чтобы восполнить такие “пробелы” в реконструкции и идентификации новых белок-кодирующих генов, был проведен протеогеномный анализ. В ходе подробного анализа были обнаружены и отмечены на карте фруктозо-1,6-бисфосфатаза, катализирующая расщепление фосфата из фруктозо-1,6-бисфосфата на этапе гликолиза. Используя описанный подход, также были определены следующие ферменты: гистидинкиназа, нуклеозид (ксантозин) пермеаза и флаводоксин. Ранее в ходе анализа в метаболоме NTBF и ETVF везикул был обнаружен ксантозин, но его предшественники и специфические катаболические ферменты биосинтеза ксантозина не идентифицированы. Ксантозин пермеаза (ХарВ), которая была определена в ходе протеогеномного анализа, позволила восполнить “пробел” в метаболической карте, таким образом, определив собою фермент, катализирующий импорт ксантозина в везикулы. Гистидинкиназа, обнаруженная и отображенная на реконструированной метаболической карте, играет важную роль в передаче сигнала у прокариот и необходима для клеточной адаптации к изменяющимся условиям внешней среды [148]. Выявленный фермент, ответственный за адаптацию к стрессу – флаводоксин известен своим участием в определении чувствительности *B.fragilis* к метронидазолу [149].

### 3.12 Метаболомное исследование с применением изотопно-меченого метаболита

Метаболомное исследование с применением изотопно-меченого метаболита или флаксомный метаболомный анализ применяется для доказательства наличия ферментативной активности биохимических реакций, протекающих в *in vitro* и *in vivo* системах. С этой целью в функционирующую систему осуществляется добавка изотопно-меченого метаболита изучаемой биохимической реакции с последующим детектированием продуктов метаболизма. Так как в ходе протеомного и метаболомного анализа везикул ETBF 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 применен метод флаксомного анализа. Для этой цели изолированные везикулы обоих штаммов были инкубированы с изотопно-меченой глюкозой -  $^{13}\text{C}_6$ , с последующим метаболомным анализом (**Рисунок 43А**). 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 -  $^{13}\text{C}_6$  в ETBF везикулах свидетельствовало о наличии активных переносчиков глюкозы в мембране везикулы. D-эритроза-4-фосфат представляет собой уникальный промежуточный метаболит пентозофосфатного пути, участвующий в образовании D-фруктозо-6-фосфата. Обнаружение данного метаболита свидетельствовало об активности ферментов гликолиза и пентозо-фосфатного пути в везикулах ETBF. Глицерин-Р- $^{13}\text{C}$  обычно используется для синтеза липидов бактериальных клеток и может быть получен дегидрированием D-глицеральдегид-3-фосфата. Кроме того было обнаружено, стабильное уменьшение D-глицеральдегид-3-фосфата в везикулах ETBF на третьем часу инкубации, что указывает на окончание процессов обмена. Во время реконструкции метаболической карты, рfкА способствующая фосфорилированию D-фруктозо-6-фосфата не была

идентифицирована. Но согласно данным флаксомного анализа, активность данного фермента при наличии соответствующего субстрата подтверждает факт наличия данного фермента в составе везикул ETBF. Важно отметить, что протеомные и метаболомные данные NTBF полностью соответствовали результатам флаксомного анализа, т.е. обнаружить метаболическую активность в NTBF везикулах не удалось (Рисунок 43 Б).



**Рисунок 43** Флаксомный эксперимент (А)-Основные этапы эксперимента включают в себя инкубацию выделенных везикул с изотопом глюкозы с последующим выделением и очисткой везикул. Экстрагированные метаболиты используются для последующего анализа. (Б)-Реконструированная карта гликолиза ETBF OMV. Меченые метаболиты глюкозы, такие как  $^{13}C_4$ -D-эритрозо-4Ф и  $^{13}C_3$ -глицерол-3Ф были обнаружены только в ETBF OMV.,  $^{13}C_6$ -D-глюкоза и продукты катаболизма  $^{13}C_6$ -D-глюкозы -  $^{13}C_4$ -D-эритрозо-4Ф и  $^{13}C_3$ -глицерол-3Ф обозначены красными звездами

#### 4.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа является первым сравнительным исследованием везикул *B.fragilis*, в результате которого охарактеризован биохимический профиль везикул, а также определены механизмы секреции и доставки токсина *B.fragilis* до клеток мишеней. Впервые для везикул двух гомологичных штаммов проведено протеомное и метаболомное профилирование, дополненное флаксомным анализом, 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 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 данные о наличии метаболической активности в везикулах токсигенного штамма, тогда как для везикул нетоксигенного штамма указанная активность не установлена. Согласно данным протеометаболомного реконструирования, дополненного результатами флаксомного анализа 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 входящих в состав везикул белков, являющихся потенциальными факторами вирулентности, среди которых – пататин, пирин, ряд гемолизин и др, определенный в составе везикул токсин, 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*.

## 5. 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 во фракции везикул. Методами ТЭМ с применением антител, меченных золотом, а также иммуноблота, определена локализация токсина в составе мембраны везикулы. Методами компьютерного моделирования, флюоресцентного тушения белка, а также ЯМР показана высокая тропность токсина к фосфолипидам.
3. В ходе экспериментов с использованием культуры клеток НТ-29/С1 и токсин-содержащих везикул, показана активность токсина в отношении известного субстрата – белка межклеточных контактов – E-кадгерина. Эксперименты с применением липосом позволили утверждать мембранную ассоциацию токсина с ориентацией активного центра белка кнаружи.
4. Совокупный протеометаболомный анализ, дополненный результатами метаболомного исследования с применением изотопно-меченого метаболита, позволил определить метаболическую активность везикул токсигенного штамма, подтверждающий выявленные отличия в метаболомах везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов *B.fragilis*. Определен период метаболической активности биохимических реакций, протекающих в везикулах, который составляет 3 часа.

## 6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ETBF – enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (энтеротоксигенный *B.fragilis*)

NTBF – nontoxigenic *Bacteroides fragilis* (нетоксигенный *B.fragilis*)

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

OMV – outer membrane vesicles (внешнемембранные везикулы)

PC – phosphatidylcholine (фосфатидилхолин)

PE – phosphatidylethanolamine (фосфатидилэтанолламин)

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

emPAI - Exponentially Modified Protein Abundance Index

ЛПС – липополисахарид

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

БСА – бычий сывороточный альбумин

PSC – polysaccharide chain

ГХ- газовая хроматография

ВЭЖХ-МС/МС - комплекс высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии

ЯМР- ядерный магнитный резонанс

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК - рибонуклеиновая кислота

ЦТК - цикл трикарбоновых кислот

ФАД - флавинадениндинуклеотид

ФМН - флавинмононуклеотид

НАДФ/НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфат/восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата

НАД/НАДН - никотинамидадениндинуклеотид/ восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида

АМФ - аденозинмонофосфат

АДФ - аденозиндифосфат

АТФ - аденозинтрифосфат

дАТФ - дезоксиаденозинтрифосфат

ГМФ - гуанозинмонофосфат

ГДФ - гуанозиндифосфат

ГТФ - гуанозинтрифосфат

УМФ - уридинмонофосфат

дУТФ - дезоксиуридинмонофосфат

дУДФ - дезоксиуридиндифосфат

ЦМФ - цитидинмонофосфат

дТДФ - дезокситимидиндифосфат

дТТФ – дезокситимидинтрифосфат

## 7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salyers A. A. Bacteroides of the human lower intestinal tract. // *Annu Rev Microbiol.* - 1984. - Vol. 38. - №. - P. 293-313.
2. Wexler H. M. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. // *Clin Microbiol Rev.* - 2007. - Vol. 20. - № 4. - P. 593-621.
3. Elhenawy W., Debelyy M. O., Feldman M. F. Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into Bacteroides outer membrane vesicles. // *MBio.* - 2014. - Vol. 5. - № 2. - P. e00909-00914.
4. Prindiville T. P., Sheikh R. A., Cohen S. H., Tang Y. J., Cantrell M. C., Silva J., Jr. Bacteroides fragilis enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. // *Emerg Infect Dis.* - 2000. - Vol. 6. - № 2. - P. 171-174.
5. Purcell R. V., Pearson J., Aitchison A., Dixon L., Frizelle F. A., Keenan J. I. Colonization with enterotoxigenic Bacteroides fragilis is associated with early-stage colorectal neoplasia. // *PLoS One.* - - Vol. 12. - № 2. - P. e0171602.
6. Boleij A., et al. The Bacteroides fragilis toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. // *Clin Infect Dis.* - - Vol. 60. - № 2. - P. 208-215.
7. Myers L. L., Firehammer B. D., Shoop D. S., Border M. M. Bacteroides fragilis: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. // *Infect Immun.* - 1984. - Vol. 44. - № 2. - P. 241-244.
8. Van Tassell R. L., Lyerly D. M., Wilkins T. D. Purification and characterization of an enterotoxin from Bacteroides fragilis. // *Infect Immun.* - 1992. - Vol. 60. - № 4. - P. 1343-1350.
9. Chambers F. G., Koshy S. S., Saidi R. F., Clark D. P., Moore R. D., Sears C. L. Bacteroides fragilis toxin exhibits polar activity on monolayers of human intestinal epithelial cells (T84 cells) in vitro. // *Infect Immun.* - 1997. - Vol. 65. - № 9. - P. 3561-3570.
10. Franco A. A., Mundy L. M., Trucksis M., Wu S., Kaper J. B., Sears C. L. Cloning and characterization of the Bacteroides fragilis metalloprotease toxin gene. // *Infect Immun.* - 1997. - Vol. 65. - № 3. - P. 1007-1013.

11. Saidi R. F., Jaeger K., Montrose M. H., Wu S., Sears C. L. Bacteroides fragilis toxin rearranges the actin cytoskeleton of HT29/C1 cells without direct proteolysis of actin or decrease in F-actin content. // Cell Motil Cytoskeleton. - 1997. - Vol. 37. - № 2. - P. 159-165.
12. Pantosti A., Menozzi M. G., Frate A., Sanfilippo L., D'Ambrosio F., Malpeli M. Detection of enterotoxigenic Bacteroides fragilis and its toxin in stool samples from adults and children in Italy. // Clin Infect Dis. - 1997. - Vol. 24. - № 1. - P. 12-16.
13. Saidi R. F., Sears C. L. Bacteroides fragilis toxin rapidly intoxicates human intestinal epithelial cells (HT29/C1) in vitro. // Infect Immun. - 1996. - Vol. 64. - № 12. - P. 5029-5034.
14. Wu S., Rhee K. J., Zhang M., Franco A., Sears C. L. Bacteroides fragilis toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and gamma-secretase-dependent E-cadherin cleavage. // J Cell Sci. - 2007. - Vol. 120. - № Pt 11. - P. 1944-1952.
15. Sears C. L., Buckwold S. L., Shin J. W., Franco A. A. The C-terminal region of Bacteroides fragilis toxin is essential to its biological activity. // Infect Immun. - 2006. - Vol. 74. - № 10. - P. 5595-5601.
16. Obiso R. J., Jr., Bevan D. R., Wilkins T. D. Molecular modeling and analysis of fragilysin, the Bacteroides fragilis toxin. // Clin Infect Dis. - 1997. - Vol. 25 Suppl 2. - №. - P. S153-155.
17. Hwang S., Gwon S. Y., Kim M. S., Lee S., Rhee K. J. Bacteroides fragilis Toxin Induces IL-8 Secretion in HT29/C1 Cells through Disruption of E-cadherin Junctions. // Immune Netw. - - Vol. 13. - № 5. - P. 213-217.
18. Kharlampieva D., et al. Recombinant fragilysin isoforms cause E-cadherin cleavage of intact cells and do not cleave isolated E-cadherin. // Microb Pathog. - 2015. - Vol. 83-84. - №. - P. 47-56.
19. Wu S., Shin J., Zhang G., Cohen M., Franco A., Sears C. L. The Bacteroides fragilis toxin binds to a specific intestinal epithelial cell receptor. // Infect Immun. - 2006. - Vol. 74. - № 9. - P. 5382-5390.

20. Choi V. M., et al. Activation of *Bacteroides fragilis* toxin by a novel bacterial protease contributes to anaerobic sepsis in mice. // *Nat Med.* - 2016. - Vol. 22. - № 5. - P. 563-567.
21. Wilson M. M., Anderson D. E., Bernstein H. D. Analysis of the outer membrane proteome and secretome of *Bacteroides fragilis* reveals a multiplicity of secretion mechanisms. // *PLoS One.* - 2015. - Vol. 10. - № 2. - P. e0117732.
22. Coyne M. J., Roelofs K. G., Comstock L. E. Type VI secretion systems of human gut *Bacteroidales* segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements. // *BMC Genomics.* - 2016. - Vol. 17. - № 1. - P. 58.
23. Chatzidaki-Livanis M., Geva-Zatorsky N., Comstock L. E. *Bacteroides fragilis* type VI secretion systems use novel effector and immunity proteins to antagonize human gut *Bacteroidales* species. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2016. - Vol. 113. - № 13. - P. 3627-3632.
24. Kuehn M. J., Kesty N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. // *Genes Dev.* - 2005. - Vol. 19. - № 22. - P. 2645-2655.
25. Chatterjee D., Chaudhuri K. Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells. // *FEBS Lett.* - - Vol. 585. - № 9. - P. 1357-1362.
26. Dutta S., Iida K., Takade A., Meno Y., Nair G. B., Yoshida S. Release of Shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and in vitro effects of antimicrobials on toxin production and release. // *Microbiol Immunol.* - 2004. - Vol. 48. - № 12. - P. 965-969.
27. Ismail S., Hampton M. B., Keenan J. I. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. // *Infect Immun.* - 2003. - Vol. 71. - № 10. - P. 5670-5675.
28. Kolling G. L., Matthews K. R. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. // *Appl Environ Microbiol.* - 1999. - Vol. 65. - № 5. - P. 1843-1848.

29. Mondal A., et al. Cytotoxic and Inflammatory responses induced by Outer Membrane Vesicles-associated biologically active Proteases from *Vibrio cholerae*. // *Infect Immun.* - - Vol. - №. - P.
30. Wai S. N., Takade A., Amako K. The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. // *Microbiol Immunol.* - 1995. - Vol. 39. - № 7. - P. 451-456.
31. Zakhazhevskaya N. B., et al. Interaction of *Bacteroides fragilis* Toxin with Outer Membrane Vesicles Reveals New Mechanism of Its Secretion and Delivery. // *Front Cell Infect Microbiol.* - 2017. - Vol. 7. - №. - P. 2.
32. Patrick S., McKenna J. P., O'Hagan S., Dermott E. A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. // *Microb Pathog.* - 1996. - Vol. 20. - № 4. - P. 191-202.
33. Parker H., Chitcholtan K., Hampton M. B., Keenan J. I. Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. // *Infect Immun.* - 2010. - Vol. 78. - № 12. - P. 5054-5061.
34. Sears C. L., Geis A. L., Housseau F. *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis. // *J Clin Invest.* - 2014. - Vol. 124. - № 10. - P. 4166-4172.
35. Toprak N. U., et al. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. // *Clin Microbiol Infect.* - 2006. - Vol. 12. - № 8. - P. 782-786.
36. Arrieta M. C., Stiemsma L. T., Amenyogbe N., Brown E. M., Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. // *Front Immunol.* - - Vol. 5. - №. - P. 427.
37. Dawson P. A., Karpen S. J. Intestinal transport and metabolism of bile acids. // *J Lipid Res.* - 2015. - Vol. 56. - № 6. - P. 1085-1099.
38. Stellwag E. J., Hylemon P. B. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. // *Biochim Biophys Acta.* - 1976. - Vol. 452. - № 1. - P. 165-176.

39. Kasper D. L. The polysaccharide capsule of *Bacteroides fragilis* subspecies *fragilis*: immunochemical and morphologic definition. // *J Infect Dis.* - 1976. - Vol. 133. - № 1. - P. 79-87.
40. Hooper L. V., Midtvedt T., Gordon J. I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. // *Annu Rev Nutr.* - 2002. - Vol. 22. - №. - P. 283-307.
41. Reeves A. R., D'Elia J. N., Frias J., Salyers A. A. A *Bacteroides thetaiotaomicron* outer membrane protein that is essential for utilization of maltooligosaccharides and starch. // *J Bacteriol.* - 1996. - Vol. 178. - № 3. - P. 823-830.
42. Huang Y. L., Chassard C., Hausmann M., von Itzstein M., Henet T. Sialic acid catabolism drives intestinal inflammation and microbial dysbiosis in mice. // *Nat Commun.* - 2015. - Vol. 6. - №. - P. 8141.
43. Bjursell M. K., Martens E. C., Gordon J. I. Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. // *J Biol Chem.* - 2006. - Vol. 281. - № 47. - P. 36269-36279.
44. Flint H. J., Bayer E. A., Rincon M. T., Lamed R., White B. A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. // *Nat Rev Microbiol.* - 2008. - Vol. 6. - № 2. - P. 121-131.
45. Ridlon J. M., Kang D. J., Hylemon P. B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. // *J Lipid Res.* - 2006. - Vol. 47. - № 2. - P. 241-259.
46. Hirano S., Masuda N., Mukai H., Hirakawa K., Imamura T. [Transformation of bile acids by *Bacteroides fragilis* strains isolated from the human intestine (author's transl)]. // *Nihon Saikingaku Zasshi.* - 1979. - Vol. 34. - № 2. - P. 403-411.
47. Pumbwe L., Skilbeck C. A., Nakano V., Avila-Campos M. J., Piazza R. M., Wexler H. M. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. // *Microb Pathog.* - 2007. - Vol. 43. - № 2-3. - P. 78-87.

48. Galan J. E., Lara-Tejero M., Marlovits T. C., Wagner S. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. // *Annu Rev Microbiol.* - 2014. - Vol. 68. - №. - P. 415-438.
49. Wallden K., Rivera-Calzada A., Waksman G. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. // *Cell Microbiol.* - 2010. - Vol. 12. - № 9. - P. 1203-1212.
50. Hachani A., Wood T. E., Filloux A. Type VI secretion and anti-host effectors. // *Curr Opin Microbiol.* - 2016. - Vol. 29. - №. - P. 81-93.
51. Hachani A., Wood T. E., Filloux A. Type VI secretion and anti-host effectors. // *Curr Opin Microbiol.* - - Vol. 29. - №. - P. 81-93.
52. Wang R. C., Seror S. J., Blight M., Pratt J. M., Broome-Smith J. K., Holland I. B. Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. // *J Mol Biol.* - 1991. - Vol. 217. - № 3. - P. 441-454.
53. Shen Y., Giardino Torchia M. L., Lawson G. W., Karp C. L., Ashwell J. D., Mazmanian S. K. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. // *Cell Host Microbe.* - 2012. - Vol. 12. - № 4. - P. 509-520.
54. Beveridge T. J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. // *J Bacteriol.* - 1999. - Vol. 181. - № 16. - P. 4725-4733.
55. Steimle A., Autenrieth I. B., Frick J. S. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. // *Int J Med Microbiol.* - - Vol. 306. - № 5. - P. 290-301.
56. Wessel A. K., Liew J., Kwon T., Marcotte E. M., Whiteley M. Role of *Pseudomonas aeruginosa* peptidoglycan-associated outer membrane proteins in vesicle formation. // *J Bacteriol.* - - Vol. 195. - № 2. - P. 213-219.
57. Deatherage B. L., Lara J. C., Bergsbaken T., Rassouljian Barrett S. L., Lara S., Cookson B. T. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. // *Mol Microbiol.* - 2009. - Vol. 72. - № 6. - P. 1395-1407.

58. Galka F., et al. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. // *Infect Immun.* - 2008. - Vol. 76. - № 5. - P. 1825-1836.
59. Kwon S. O., Gho Y. S., Lee J. C., Kim S. I. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. // *FEMS Microbiol Lett.* - 2009. - Vol. 297. - № 2. - P. 150-156.
60. Perez-Cruz C., Carrion O., Delgado L., Martinez G., Lopez-Iglesias C., Mercade E. New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: implications for DNA content. // *Appl Environ Microbiol.* - - Vol. 79. - № 6. - P. 1874-1881.
61. Altindis E., Fu Y., Mekalanos J. J. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2014. - Vol. 111. - № 15. - P. E1548-1556.
62. Lee E. Y., et al. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. // *Proteomics.* - 2007. - Vol. 7. - № 17. - P. 3143-3153.
63. Kahn M. E., Barany F., Smith H. O. Transformasomes: specialized membranous structures that protect DNA during *Haemophilus* transformation. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1983. - Vol. 80. - № 22. - P. 6927-6931.
64. Kadurugamuwa J. L., Beveridge T. J. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. // *J Bacteriol.* - 1995. - Vol. 177. - № 14. - P. 3998-4008.
65. Renelli M., Matias V., Lo R. Y., Beveridge T. J. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. // *Microbiology.* - 2004. - Vol. 150. - № Pt 7. - P. 2161-2169.
66. Ellis T. N., Kuehn M. J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. // *Microbiol Mol Biol Rev.* - - Vol. 74. - № 1. - P. 81-94.
67. Horstman A. L., Kuehn M. J. Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. // *J Biol Chem.* - 2002. - Vol. 277. - № 36. - P. 32538-32545.

68. Kato S., Kowashi Y., Demuth D. R. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. // *Microb Pathog.* - 2002. - Vol. 32. - № 1. - P. 1-13.
69. Kesty N. C., Mason K. M., Reedy M., Miller S. E., Kuehn M. J. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. // *EMBO J.* - 2004. - Vol. 23. - № 23. - P. 4538-4549.
70. Ricci V., et al. Free-soluble and outer membrane vesicle-associated VacA from *Helicobacter pylori*: Two forms of release, a different activity. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2005. - Vol. 337. - № 1. - P. 173-178.
71. Wai S. N., et al. Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. // *Cell.* - 2003. - Vol. 115. - № 1. - P. 25-35.
72. Yokoyama K., et al. Production of shiga toxin by *Escherichia coli* measured with reference to the membrane vesicle-associated toxins. // *FEMS Microbiol Lett.* - 2000. - Vol. 192. - № 1. - P. 139-144.
73. Horstman A. L., Bauman S. J., Kuehn M. J. Lipopolysaccharide 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) core determines bacterial association of secreted toxins. // *J Biol Chem.* - 2004. - Vol. 279. - № 9. - P. 8070-8075.
74. Kesty N. C., Kuehn M. J. Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. // *J Biol Chem.* - 2004. - Vol. 279. - № 3. - P. 2069-2076.
75. Gamage S. D., McGannon C. M., Weiss A. A. *Escherichia coli* serogroup O107/O117 lipopolysaccharide binds and neutralizes Shiga toxin 2. // *J Bacteriol.* - 2004. - Vol. 186. - № 16. - P. 5506-5512.
76. Keenan J., et al. A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. // *FEMS Microbiol Lett.* - 2000. - Vol. 182. - № 2. - P. 259-264.
77. Yahiro K., et al. *Helicobacter pylori* VacA induces apoptosis by accumulation of connexin 43 in autophagic vesicles via a Rac1/ERK-dependent pathway. // *Cell Death Discov.* - Vol. 1. - №. - P. 15035.

78. Rudek W., Haque R. U. Extracellular enzymes of the genus *Bacteroides*. // *J Clin Microbiol.* - 1976. - Vol. 4. - № 5. - P. 458-460.
79. Guzman C. A., Plate M., Pruzzo C. Role of neuraminidase-dependent adherence in *Bacteroides fragilis* attachment to human epithelial cells. // *FEMS Microbiol Lett.* - 1990. - Vol. 59. - № 1-2. - P. 187-192.
80. Aguilera L., et al. Proteomic analysis of outer membrane vesicles from the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917. // *Proteomics.* - - Vol. 14. - № 2-3. - P. 222-229.
81. Altindis E., Fu Y., Mekalanos J. J. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - - Vol. 111. - № 15. - P. E1548-1556.
82. Chen Y., Liu L., Fu H., Wei C., Jin Q. Comparative proteomic analysis of outer membrane vesicles from *Shigella flexneri* under different culture conditions. // *Biochem Biophys Res Commun.* - - Vol. 453. - № 4. - P. 696-702.
83. Ellis T. N., Kuehn M. J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. // *Microbiol Mol Biol Rev.* - 2010. - Vol. 74. - № 1. - P. 81-94.
84. Henry T., Pommier S., Journet L., Bernadac A., Gorvel J. P., Llobes R. Improved methods for producing outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. // *Res Microbiol.* - 2004. - Vol. 155. - № 6. - P. 437-446.
85. O'Donoghue E. J., Krachler A. M. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. // *Cell Microbiol.* - - Vol. 18. - № 11. - P. 1508-1517.
86. Pathirana R. D., Kaparakis-Liaskos M. Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, immune regulation and pathogenesis. // *Cell Microbiol.* - - Vol. 18. - № 11. - P. 1518-1524.
87. Mazmanian S. K. Capsular polysaccharides of symbiotic bacteria modulate immune responses during experimental colitis. // *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* - 2008. - Vol. 46 Suppl 1. - №. - P. E11-12.
88. Troy E. B., Kasper D. L. Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system. // *Front Biosci (Landmark Ed).* - - Vol. 15. - №. - P. 25-34.

89. Mazmanian S. K., Round J. L., Kasper D. L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. // *Nature*. - 2008. - Vol. 453. - № 7195. - P. 620-625.
90. Telesford K. M., et al. A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39(+)Foxp3(+) T cells and Treg function. // *Gut Microbes*. - - Vol. 6. - № 4. - P. 234-242.
91. Chu H., et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. // *Science*. - - Vol. 352. - № 6289. - P. 1116-1120.
92. Chu H., et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. // *Science*. - 2016. - Vol. 352. - № 6289. - P. 1116-1120.
93. Myers L. L., Shoop D. S., Firehammer B. D., Border M. M. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in calves. // *J Infect Dis*. - 1985. - Vol. 152. - № 6. - P. 1344-1347.
94. Border M., Firehammer B. D., Shoop D. S., Myers L. L. Isolation of *Bacteroides fragilis* from the feces of diarrheic calves and lambs. // *J Clin Microbiol*. - 1985. - Vol. 21. - № 3. - P. 472-473.
95. Moncrief J. S., et al. The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. // *Infect Immun*. - 1995. - Vol. 63. - № 1. - P. 175-181.
96. Franco A. A. The *Bacteroides fragilis* pathogenicity island is contained in a putative novel conjugative transposon. // *J Bacteriol*. - 2004. - Vol. 186. - № 18. - P. 6077-6092.
97. Wu S., Lim K. C., Huang J., Saidi R. F., Sears C. L. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1998. - Vol. 95. - № 25. - P. 14979-14984.
98. Huber P., et al. Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse VE-cadherin gene (*Cdh5*). // *Genomics*. - 1996. - Vol. 32. - № 1. - P. 21-28.
99. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. // *Science*. - 1991. - Vol. 251. - № 5000. - P. 1451-1455.

100. Dantzig A. H., et al. Association of intestinal peptide transport with a protein related to the cadherin superfamily. // *Science*. - 1994. - Vol. 264. - № 5157. - P. 430-433.
101. Thomson R. B., et al. Isolation and cDNA cloning of Ksp-cadherin, a novel kidney-specific member of the cadherin multigene family. // *J Biol Chem*. - 1995. - Vol. 270. - № 29. - P. 17594-17601.
102. Birchmeier W., Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. // *Biochim Biophys Acta*. - 1994. - Vol. 1198. - № 1. - P. 11-26.
103. Matheson J., et al. Epithelial-mesenchymal transition and nuclear beta-catenin induced by conditional intestinal disruption of Cdh1 with Apc is E-cadherin EC1 domain dependent. // *Oncotarget*. - - Vol. 7. - № 43. - P. 69883-69902.
104. Wu S., Morin P. J., Maouyo D., Sears C. L. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. // *Gastroenterology*. - 2003. - Vol. 124. - № 2. - P. 392-400.
105. Wu S, Shin J, Jhang G, Cohen M, Franco A, Sears CL. The *Bacteroides fragilis* toxin binds to a specific intestinal epithelial cell receptor. // *Infect Immun*. - 2006 -Vol. 74. - № 9. - P. 5382-5390.
106. Lindmark B., et al. Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. // *BMC Microbiol*. - 2009. - Vol. 9. - №. - P. 220.
107. Nikitina A. S., et al. Complete Genome Sequence of an Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Clinical Isolate. // *Genome Announc*. - 2015. - Vol. 3. - № 3. - P.
108. Li H., et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. // *Bioinformatics*. - 2009. - Vol. 25. - № 16. - P. 2078-2079.
109. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. // *Bioinformatics*. - 2014. - Vol. 30. - № 14. - P. 2068-2069.
110. Putluri N., et al. Metabolomic profiling reveals potential markers and bioprocesses altered in bladder cancer progression. // *Cancer Res*. - 2011. - Vol. 71. - № 24. - P. 7376-7386.

111. Fiehn O., Garvey W. T., Newman J. W., Lok K. H., Hoppel C. L., Adams S. H. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. // *PLoS One*. - 2010. - Vol. 5. - № 12. - P. e15234.
112. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. // *J Biol Chem*. - 1957. - Vol. 226. - № 1. - P. 497-509.
113. Yi E. C., Hackett M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. // *Analyst*. - 2000. - Vol. 125. - № 4. - P. 651-656.
114. Totrov M., Abagyan R. Protein-Ligand docking as an Energy Optimization Problem. // *Drug-ReseptorThermodynamics: Introduction and Applications*. - 2001 -Vol. - №. - P. 603-624.
115. Abagyan R., Totrov M., Kuznetsov D. ICM, a new method for protein modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation; . *J. Comput. Chem.*, , 1994:488-506.
116. Balayssac S., Delsuc M. A., Gilard V., Prigent Y., Malet-Martino M. Two-dimensional DOSY experiment with Excitation Sculpting water suppression for the analysis of natural and biological media. // *J Magn Reson*. - 2009. - Vol. 196. - № 1. - P. 78-83.
117. Chou J. J., Baber J. L., Bax A. Characterization of phospholipid mixed micelles by translational diffusion. // *J Biomol NMR*. - 2004. - Vol. 29. - № 3. - P. 299-308.
118. Lee E. Y., et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. // *Proteomics*. - 2009. - Vol. 9. - № 24. - P. 5425-5436.
119. Berlanda Scorza F., et al. Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* DeltatolR IHE3034 mutant. // *Mol Cell Proteomics*. - 2008. - Vol. 7. - № 3. - P. 473-485.
120. Bielaszewska M., et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis. // *PLoS Pathog*. - - Vol. 9. - № 12. - P. e1003797.

121. Chatterjee D., Chaudhuri K. *Vibrio cholerae* O395 outer membrane vesicles modulate intestinal epithelial cells in a NOD1 protein-dependent manner and induce dendritic cell-mediated Th2/Th17 cell responses. // *J Biol Chem.* - - Vol. 288. - № 6. - P. 4299-4309.
122. Ellen A. F., et al. Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. // *Extremophiles.* - 2009. - Vol. 13. - № 1. - P. 67-79.
123. Gardy J. L., et al. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. // *Bioinformatics.* - 2005. - Vol. 21. - № 5. - P. 617-623.
124. Yu N. Y., et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. // *Bioinformatics.* - 2010. - Vol. 26. - № 13. - P. 1608-1615.
125. Shipman J. A., Berleman J. E., Salyers A. A. Characterization of four outer membrane proteins involved in binding starch to the cell surface of *Bacteroides thetaiotaomicron*. // *J Bacteriol.* - 2000. - Vol. 182. - № 19. - P. 5365-5372.
126. Wei B., et al. Molecular cloning of a *Bacteroides caccae* TonB-linked outer membrane protein identified by an inflammatory bowel disease marker antibody. // *Infect Immun.* - 2001. - Vol. 69. - № 10. - P. 6044-6054.
127. Tomitsuka E., Hirawake H., Goto Y., Taniwaki M., Harada S., Kita K. Direct evidence for two distinct forms of the flavoprotein subunit of human mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone reductase). // *J Biochem.* - 2003. - Vol. 134. - № 2. - P. 191-195.
128. Schumann W. FtsH--a single-chain chaperonin? // *FEMS Microbiol Rev.* - 1999. - Vol. 23. - № 1. - P. 1-11.
129. Gonzalez V., Pal R., Narayan M. The oxidoreductase behavior of protein disulfide isomerase impedes fold maturation of endoplasmic reticulum-processed proteins in the pivotal structure-coupled step of oxidative folding: implications for subcellular protein trafficking. // *Biochemistry.* - 2010. - Vol. 49. - № 29. - P. 6282-6289.

130. Asai Y., Yakushi T., Kawagishi I., Homma M. Ion-coupling determinants of Na<sup>+</sup>-driven and H<sup>+</sup>-driven flagellar motors. // *J Mol Biol.* - 2003. - Vol. 327. - № 2. - P. 453-463.
131. Brenot A., King K. Y., Janowiak B., Griffith O., Caparon M. G. Contribution of glutathione peroxidase to the virulence of *Streptococcus pyogenes*. // *Infect Immun.* - 2004. - Vol. 72. - № 1. - P. 408-413.
132. Soo P. C., et al. Pirin regulates pyruvate catabolism by interacting with the pyruvate dehydrogenase E1 subunit and modulating pyruvate dehydrogenase activity. // *J Bacteriol.* - 2007. - Vol. 189. - № 1. - P. 109-118.
133. Rocha E. R., Smith C. J. Ferritin-like family proteins in the anaerobe *Bacteroides fragilis*: when an oxygen storm is coming, take your iron to the shelter. // *Biometals.* - 2010. - Vol. 26. - № 4. - P. 577-591.
134. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. // *J Biol Chem.* - 1989. - Vol. 264. - № 24. - P. 13963-13966.
135. Marzan L. W., Shimizu K. Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its *phoB* and *phoR* genes knockout mutants under phosphate and nitrogen limitations as well as at acidic condition. // *Microb Cell Fact.* - 2011. - Vol. 10. - №. - P. 39.
136. Kothary M. H., et al. Analysis and Characterization of Proteins Associated with Outer Membrane Vesicles Secreted by *Cronobacter* spp. // *Front Microbiol.* - - Vol. 8. - №. - P. 134.
137. Nakayama-Imaohji H., et al. DNA Inversion Regulates Outer Membrane Vesicle Production in *Bacteroides fragilis*. // *PLoS One.* - - Vol. 11. - № 2. - P. e0148887.
138. Tobin Magle C., Pittman K. J., Moser L. A., Boldon K. M., Knoll L. J. A toxoplasma patatin-like protein changes localization and alters the cytokine response during toxoplasmic encephalitis. // *Infect Immun.* - 2014. - Vol. 82. - № 2. - P. 618-625.
139. Anderson D. M., Sato H., Dirck A. T., Feix J. B., Frank D. W. Ubiquitin activates patatin-like phospholipases from multiple bacterial species. // *J Bacteriol.* - 2015. - Vol. 197. - № 3. - P. 529-541.
140. Ferreira R., et al. Expression of *Bacteroides fragilis* virulence markers in vitro. // *J Med Microbiol.* - 1999. - Vol. 48. - № 11. - P. 999-1004.

141. Dua R., Wu S. K., Cho W. A structure-function study of bovine pancreatic phospholipase A2 using polymerized mixed liposomes. // *J Biol Chem.* - 1995. - Vol. 270. - № 1. - P. 263-268.
142. Kraft C. A., Garrido J. L., Leiva-Vega L., Romero G. Quantitative analysis of protein-lipid interactions using tryptophan fluorescence. // *Sci Signal.* - 2009. - Vol. 2. - № 99. - P. pl4.
143. Charbonneau D. M., Tajmir-Riahi H. A. Study on the interaction of cationic lipids with bovine serum albumin. // *J Phys Chem B.* - - Vol. 114. - № 2. - P. 1148-1155.
144. Huang J. Y., Lee S. M., Mazmanian S. K. The human commensal *Bacteroides fragilis* binds intestinal mucin. // *Anaerobe.* - 2011 -Vol. 17. - № 4. - P. 137-141.
145. Duan L., Chen X., Alexander J. W. Regulatory effect of histamine on the barrier function of intestinal mucosal. // *J Gastrointest Surg.* - 2010. - Vol. 14. - № 7. - P. 1180-1185.
146. Thomas H. IBD: Probiotics for IBD: a need for histamine? // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* - 2016. - Vol. 13. - № 2. - P. 62-63.
147. Lyte M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. // *Bioessays.* - 2011. - Vol. 33. - № 8. - P. 574-581.
148. Dutta R., Qin L., Inouye M. Histidine kinases: diversity of domain organization. // *Mol Microbiol.* - 1999. - Vol. 34. - № 4. - P. 633-640.
149. Diniz C. G., Farias L. M., Carvalho M. A., Rocha E. R., Smith C. J. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. // *J Antimicrob Chemother.* - 2004. - Vol. 54. - № 1. - P. 100-108.

## 8. ПРИЛОЖЕНИЕ

### 8.1 Геномные отличия ЕТВФ и НТВФ штаммов

Геномные отличия ЕТВФ от НТВФ		
VU15_00355_hypothetical_protein	VU15_05010_DNA-binding_protein	VU15_11095_hypothetical_protein
VU15_00360_hypothetical_protein	VU15_05020_hypothetical_protein	VU15_11105_hypothetical_protein
VU15_00365_hypothetical_protein	VU15_05025_hypothetical_protein	VU15_11110_DNA-binding_protein
VU15_00735_hypothetical_protein	VU15_05055_restriction_endonuclease_subunit_S	VU15_11130_DNA-binding_protein
VU15_00740_hypothetical_protein	VU15_05060_restriction_endonuclease_subunit_S	VU15_11140_hypothetical_protein
VU15_00745_hypothetical_protein	VU15_05065_integrase	VU15_11165_hypothetical_protein
VU15_00755_hypothetical_protein	VU15_05075_excisionase	VU15_11175_hypothetical_protein
VU15_00760_hypothetical_protein	VU15_05090_transposase	VU15_11200_hypothetical_protein
VU15_01030_hypothetical_protein	VU15_05970_acyl_carrier_protein	VU15_11210_hypothetical_protein
VU15_01575_hypothetical_protein	VU15_05980_3-oxoacyl-ACP_reductase	VU15_11235_hypothetical_protein
VU15_02335_hypothetical_protein	VU15_05985_acetyltransferase	VU15_11240_hypothetical_protein
VU15_02345_hypothetical_protein	VU15_05990_mannose-1-phosphate_guanylyltransferase	VU15_11250_mobilization_protein
VU15_02365_hypothetical_protein	VU15_07820_hypothetical_protein	VU15_11260_conjugal_transfer_protein_TraN
VU15_02380_transcriptional_regulator	VU15_07945_hypothetical_protein	VU15_11265_conjugal_transfer_protein_TraM
VU15_02385_regulatory_protein	VU15_08305_hypothetical_protein	VU15_11270_hypothetical_protein
VU15_02390_hypothetical_protein	VU15_08310_hypothetical_protein	VU15_11280_membrane_protein
VU15_02400_excisionase	VU15_08470_membrane_protein	VU15_11285_hypothetical_protein
VU15_02405_riboflavin_biosynthesis_protein_RibD	VU15_08475_membrane_protein	VU15_11290_hypothetical_protein
VU15_02415_hypothetical_protein	VU15_08490_hypothetical_protein	VU15_11295_hypothetical_protein
VU15_02430_hypothetical_protein	VU15_08500_hypothetical_protein	VU15_11305_plasmid_transfer_protein
VU15_02445_hypothetical_protein	VU15_08510_hypothetical_protein	VU15_11310_transposase
VU15_02450_hypothetical_protein	VU15_08515_hypothetical_protein	VU15_11315_hypothetical_protein
VU15_02455_hypothetical_protein	VU15_08535_hypothetical_protein	VU15_11325_hypothetical_protein
VU15_02460_conjugal_transfer_protein_TraA	VU15_08560_TetR_family_transcriptional_regulator	VU15_11330_chromosome_partitioning_protein_ParA
VU15_02465_conjugal_transfer_protein	VU15_08625_acyltransferase	VU15_11340_hypothetical_protein
VU15_02470_hypothetical_protein	VU15_08630_glycosyl_transferase_family_A	VU15_11520_CDP-glucose_4,6-dehydratase
VU15_02480_conjugal_transfer_protein_TraF	VU15_08640_glycosyl_transferase	VU15_11525_glucose-1-phosphate_cytidylyltransferase
VU15_02490_conjugal_transfer_protein_TraH	VU15_08980_short-chain_dehydrogenase	VU15_11735_XRE_family_transcriptional_regulator
VU15_02505_conjugal_transfer_protein	VU15_08985_AraC_family_transcriptional_regulator	VU15_11740_hypothetical_protein
VU15_02510_conjugal_transfer_protein	VU15_08990_gamma-carboxymuconolactone_decarboxylase	VU15_11760_hypothetical_protein
VU15_02520_conjugal_transfer_protein	VU15_10100_hypothetical_protein	VU15_11765_hypothetical_protein
VU15_02525_conjugal_transfer_protein	VU15_10105_hypothetical_protein	VU15_12730_histidine_kinase
VU15_02530_conjugal_transfer_protein	VU15_10110_preprotein_translocase_subunit_SecA	VU15_12750_anti-sigma_B_factor_antagonist
VU15_02535_hypothetical_protein	VU15_11055_XRE_family_transcriptional_regulator	VU15_12760_hypothetical_protein
VU15_02540_hypothetical_protein	VU15_11060_pseudouridine_synthase	VU15_12765_hypothetical_protein
VU15_02550_antirestriction_protein	VU15_11065_hypothetical_protein	VU15_14045_hypothetical_protein
VU15_02555_DNA_repair_protein	VU15_11075_ATPase_AAA	VU15_14065_hypothetical_protein
VU15_14300_hypothetical_protein	VU15_16225_hypothetical_protein	VU15_18710_amidoligase_enzyme
VU15_14305_amidoligase_enzyme	VU15_16395_hypothetical_protein	VU15_18715_hypothetical_protein
VU15_14310_mobilization_protein	VU15_16415_dNTP-hexose_dehydratase-epimerase	VU15_18720_hypothetical_protein
VU15_14330_hypothetical_protein	VU15_18220_Fe-S_oxidoreductase	VU15_19750_hypothetical_protein
VU15_14335_fragilysin	VU15_18235_hypothetical_protein	VU15_19755_glycosyl_hydrolase

VU15_14345_hypothetical_protein	VU15_18245_hypothetical_protein	VU15_19760_hypothetical_protein
VU15_14365_RNA_polymerase	VU15_18255_hypothetical_protein	VU15_19765_membrane_protein
VU15_14390_hypothetical_protein	VU15_18310_hypothetical_protein	VU15_19780_RNA_polymerase_sigma70_factor
VU15_14400_hypothetical_protein	VU15_18315_hypothetical_protein	VU15_19930_hypothetical_protein
VU15_14410_hypothetical_protein	VU15_18320_ubiquitin	VU15_19940_hypothetical_protein
VU15_14430_hypothetical_protein	VU15_18415_hypothetical_protein	VU15_19955_hypothetical_protein
VU15_14435_DNA-binding_protein	VU15_18420_hypothetical_protein	VU15_19965_hypothetical_protein
VU15_14440_hypothetical_protein	VU15_18425_hypothetical_protein	VU15_19970_hypothetical_protein
VU15_14445_peptidase_M23	VU15_18430_hypothetical_protein	VU15_19975_hypothetical_protein
VU15_14450_conjugal_transfer_protein_TraM	VU15_18435_demethylase	VU15_19980_hypothetical_protein
VU15_14465_conjugal_transfer_protein_TraM	VU15_18445_hypothetical_protein	VU15_19985_mobilization_protein
VU15_14470_membrane_protein	VU15_18455_DNA_primase	VU15_19990_mobilization_protein
VU15_14475_membrane_protein	VU15_18460_hypothetical_protein	VU15_19995_DNA_primase
VU15_14480_conjugal_transfer_protein_TraI	VU15_18465_hypothetical_protein	VU15_20005_transcriptional_regulator
VU15_14490_membrane_protein	VU15_18470_hypothetical_protein	VU15_20010_hypothetical_protein
VU15_14495_hypothetical_protein	VU15_18475_hypothetical_protein	VU15_20565_hypothetical_protein
VU15_14500_hypothetical_protein	VU15_18480_hypothetical_protein	VU15_20570_hypothetical_protein
VU15_14505_hypothetical_protein	VU15_18485_hypothetical_protein	VU15_20580_hypothetical_protein
VU15_14510_hypothetical_protein	VU15_18490_hypothetical_protein	VU15_20585_hypothetical_protein
VU15_14530_hypothetical_protein	VU15_18520_hypothetical_protein	VU15_20595_DNA-binding_protein
VU15_14535_hypothetical_protein	VU15_18525_membrane_protein	VU15_20600_regulator
VU15_14540_hypothetical_protein	VU15_18530_conjugal_transfer_protein	VU15_20605_hypothetical_protein
VU15_14545_hypothetical_protein	VU15_18535_conjugal_transfer_protein_TraI	
VU15_14550_hypothetical_protein	VU15_18540_membrane_protein	
VU15_14555_hypothetical_protein	VU15_18545_membrane_protein	
VU15_14560_DNA_primase	VU15_18550_conjugal_transfer_protein_TraM	
VU15_14565_replication_protein	VU15_18560_membrane_protein	
VU15_14570_hypothetical_protein	VU15_18570_peptidase_M23	
VU15_14575_hypothetical_protein	VU15_18575_hypothetical_protein	
VU15_14580_demethylase	VU15_18580_DNA-binding_protein	
VU15_14590_hypothetical_protein	VU15_18595_hypothetical_protein	
VU15_14595_hypothetical_protein	VU15_18600_plasmid_partitioning_protein_ParA	
VU15_15475_hypothetical_protein	VU15_18605_hypothetical_protein	
VU15_15490_excisionase	VU15_18625_hypothetical_protein	
VU15_15495_DNA-binding_protein	VU15_18635_membrane_protein	
VU15_15510_mobilization_protein	VU15_18645_iron_dicitrate_transport_regulator_FecR	
VU15_15515_mobilization_protein	VU15_18650_RNA_polymerase	
VU15_15530_hypothetical_protein	VU15_18670_hypothetical_protein	
VU15_15535_hypothetical_protein	VU15_18675_mobilization_protein	

<b>Геномные отличия NTBF от ETBF</b>		
PROKKA_00030_hypothetical_protein	PROKKA_00871_hypothetical_protein	PROKKA_02593_Helix-turn-helix_domain_protein
PROKKA_00031_hypothetical_protein	PROKKA_00872_PKD_domain_protein	PROKKA_02595_Helix-turn-helix_domain_protein
PROKKA_00053_hypothetical_protein	PROKKA_00886_hypothetical_protein	PROKKA_02601_hypothetical_protein
PROKKA_00057_hypothetical_protein	PROKKA_00890_hypothetical_protein	PROKKA_02603_hypothetical_protein
PROKKA_00058_hypothetical_protein	PROKKA_00891_hypothetical_protein	PROKKA_02604_hypothetical_protein
PROKKA_00113_hypothetical_protein	PROKKA_00893_hypothetical_protein	PROKKA_02612_hypothetical_protein
PROKKA_00374_Helix-turn-helix_domain_protein	PROKKA_00894_hypothetical_protein	PROKKA_02615_hypothetical_protein
PROKKA_00375_hypothetical_protein	PROKKA_00901_hypothetical_protein	PROKKA_02616_Exoenzyme_S_synthesis_regulatory_protein_ExsA
PROKKA_00376_hypothetical_protein	PROKKA_00907_hypothetical_protein	PROKKA_02623_hypothetical_protein
PROKKA_00441_hypothetical_protein	PROKKA_00917_hypothetical_protein	PROKKA_02624_hypothetical_protein

PROKKA_00690_Putative_glycosyltransferase_EpsH	PROKKA_00919_hypothetical_protein	PROKKA_02625_hypothetical_protein
PROKKA_00814_Fimbrillin-A_associated_anchor_proteins_Mfa1_and_Mfa2	PROKKA_00920_Transposase_DDE_domain_p rotein	PROKKA_02627_DUF_based_on_B_Theta_Gene _description
PROKKA_00828_hypothetical_protein	PROKKA_00921_Histone_H1-like_protein_Hc1	PROKKA_02628_hypothetical_protein
PROKKA_00829_hypothetical_protein	PROKKA_00924_hypothetical_protein	PROKKA_02629_hypothetical_protein
PROKKA_00830_hypothetical_protein	PROKKA_00930_hypothetical_protein	PROKKA_02630_hypothetical_protein
PROKKA_00835_Modification_methylase_RsrI	PROKKA_00932_hypothetical_protein	PROKKA_02635_DUF_based_on_B_Theta_Gene _description
PROKKA_00836_hypothetical_protein	PROKKA_00933_hypothetical_protein	PROKKA_02636_DUF_based_on_B_Theta_Gene _description
PROKKA_00838_hypothetical_protein	PROKKA_00934_hypothetical_protein	PROKKA_02638_hypothetical_protein
PROKKA_00840_hypothetical_protein	PROKKA_00935_hypothetical_protein	PROKKA_02640_hypothetical_protein
PROKKA_00835_Modification_methylase_RsrI	PROKKA_00936_hypothetical_protein	PROKKA_02641_hypothetical_protein
PROKKA_00836_hypothetical_protein	PROKKA_00939_hypothetical_protein	PROKKA_02642_hypothetical_protein
PROKKA_00838_hypothetical_protein	PROKKA_00940_hypothetical_protein	PROKKA_02646_hypothetical_protein
PROKKA_00840_hypothetical_protein	PROKKA_00982_hypothetical_protein	PROKKA_02672_Putative_acetyltransferase_Eps M
PROKKA_00842_hypothetical_protein	PROKKA_00983_Helix-turn- helix_domain_protein	PROKKA_02676_3-oxoacyl-[acyl-carrier- protein]_reductase_FabG
PROKKA_00843_hypothetical_protein	PROKKA_01230_hypothetical_protein	PROKKA_02677_acyl_carrier_protein
PROKKA_00845_hypothetical_protein	PROKKA_01347_hypothetical_protein	PROKKA_02732_SusD_family_protein
PROKKA_00851_hypothetical_protein	PROKKA_01643_hypothetical_protein	PROKKA_02799_hypothetical_protein
PROKKA_00854_Archaeal_ATPase	PROKKA_01644_hypothetical_protein	PROKKA_02828_hypothetical_protein
PROKKA_00857_single-stranded_DNA- binding_protein	PROKKA_01647_hypothetical_protein	PROKKA_02832_hypothetical_protein
PROKKA_00858_hypothetical_protein	PROKKA_01652_hypothetical_protein	PROKKA_02855_hypothetical_protein
PROKKA_00861_hypothetical_protein	PROKKA_01656_T5orf172_domain_protein	PROKKA_02857_N-acetylmuramoyl-L- alanine_amidase
PROKKA_00870_hypothetical_protein	PROKKA_01669_hypothetical_protein	PROKKA_02861_hypothetical_protein
PROKKA_00871_hypothetical_protein	PROKKA_01675_hypothetical_protein	PROKKA_02865_hypothetical_protein
PROKKA_00872_PKD_domain_protein	PROKKA_01685_helix-turn-helix_protein	PROKKA_02898_Tyrosine_recombinase_XerC
PROKKA_02591_hypothetical_protein	PROKKA_01691_hypothetical_protein	PROKKA_02904_hypothetical_protein
PROKKA_02592_Group_II_intron- encoded_protein_LtrA	PROKKA_01692_hypothetical_protein	PROKKA_02906_Chromosome- partitioning_protein_Spo0J
PROKKA_02593_Helix-turn- helix_domain_protein	PROKKA_01779_hypothetical_protein	PROKKA_02907_hypothetical_protein
PROKKA_02595_Helix-turn- helix_domain_protein	PROKKA_02412_hypothetical_protein	PROKKA_02908_hypothetical_protein
PROKKA_02601_hypothetical_protein	PROKKA_02413_hypothetical_protein	PROKKA_02912_DUF_based_on_B_Theta_Gene _description
PROKKA_02603_hypothetical_protein	PROKKA_02570_hypothetical_protein	PROKKA_02916_hypothetical_protein
PROKKA_02604_hypothetical_protein	PROKKA_02579_Cupin_domain_protein	PROKKA_02919_hypothetical_protein
PROKKA_02612_hypothetical_protein	PROKKA_02589_RteC_protein	PROKKA_02927_hypothetical_protein
PROKKA_02615_hypothetical_protein	PROKKA_02591_hypothetical_protein	PROKKA_02928_Relaxase/mobilization_nuclease _domain_protein
PROKKA_02616_Exoenzyme_S_synthesis_regu- latory_protein_ExsA	PROKKA_02592_Group_II_intron- encoded_protein_LtrA	
PROKKA_02954_hypothetical_protein	PROKKA_02593_Helix-turn- helix_domain_protein	
PROKKA_02955_hypothetical_protein	PROKKA_02595_Helix-turn- helix_domain_protein	
PROKKA_03027_hypothetical_protein	PROKKA_02601_hypothetical_protein	
PROKKA_03028_hypothetical_protein	PROKKA_02603_hypothetical_protein	
PROKKA_03031_hypothetical_protein	PROKKA_02604_hypothetical_protein	
PROKKA_03374_hypothetical_protein	PROKKA_04174_hypothetical_protein	
PROKKA_03376_hypothetical_protein	PROKKA_04346_hypothetical_protein	
PROKKA_03378_hypothetical_protein	PROKKA_04347_hypothetical_protein	
PROKKA_03380_hypothetical_protein	PROKKA_04351_hypothetical_protein	
PROKKA_03382_hypothetical_protein	PROKKA_04352_hypothetical_protein	
PROKKA_03383_hypothetical_protein	PROKKA_04354_hypothetical_protein	
PROKKA_03385_MORN_repeat_variant	PROKKA_04355_hypothetical_protein	

PROKKA_03388_hypothetical_protein	PROKKA_04375_hypothetical_protein	
PROKKA_03389_hypothetical_protein	PROKKA_04376_mRNA_interferase_MazF9	
PROKKA_03468_ECF_RNA_polymerase_sigma_factor_SigW	PROKKA_04377_hypothetical_protein	
PROKKA_03470_hypothetical_protein	PROKKA_04381_hypothetical_protein	
PROKKA_03471_Ferredoxin-2	PROKKA_04386_hypothetical_protein	
PROKKA_03847_Lanthionine_synthetase_C-like_protein	PROKKA_04399_hypothetical_protein	
PROKKA_03856_mRNA_interferase_HigB	PROKKA_04402_hypothetical_protein	
PROKKA_03857_helix-turn-helix_protein	PROKKA_04404_hypothetical_protein	
PROKKA_03903_hypothetical_protein	PROKKA_04409_hypothetical_protein	
PROKKA_03943_Acetolactate_synthase_isozyme_1_large_subunit	PROKKA_02936_DNA-binding_protein_HU	
PROKKA_03944_2-aminoethylphosphonate--pyruvate_transaminase	PROKKA_02938_hypothetical_protein	
PROKKA_03945_dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-glucose_transaminase	PROKKA_02939_hypothetical_protein	
PROKKA_03950_Glycosyl_transferase_family_11	PROKKA_02941_hypothetical_protein	
PROKKA_04086_hypothetical_protein	PROKKA_02944_hypothetical_protein	
PROKKA_04087_hypothetical_protein	PROKKA_02945_Helix-turn-helix_domain_protein	
PROKKA_04165_Transposase_from_transposon_Tn916	PROKKA_02947_Helix-turn-helix_domain_protein	
PROKKA_04170_hypothetical_protein	PROKKA_02931_Outer_membrane_protein_A_precursor	
PROKKA_04171_hypothetical_protein	PROKKA_02932_hypothetical_protein	
PROKKA_04173_Helix-turn-helix_domain_protein	PROKKA_02933_Outer_membrane_protein_41_precursor	

## 8.2 Типы анализируемых образцов и основные оценочные характеристики.

Тип образца	Штамм	Прибор	Кол-во биоповторов	ProtDB_FDR	ProtDB_score_threshold
Цитоплазма	ETBF	Maxis	1	1,31	13
Цитоплазма	ETBF	Maxis	1	1,29	13
Цитоплазма	ETBF	Maxis	1	1,57	13
Цитоплазма	NTBF	Maxis	1	0,81	13
Цитоплазма	NTBF	Maxis	1	0,65	13
Цитоплазма	NTBF	Maxis	1	0,81	13
Цитоплазма	ETBF	Maxis	2	0,71	13
Цитоплазма	ETBF	Maxis	2	0,56	13
Цитоплазма	ETBF	Maxis	2	0,41	13
Цитоплазма	ETBF	Maxis	2	0,5	13
Цитоплазма	NTBF	Maxis	2	0,7	13
Цитоплазма	NTBF	Maxis	2	0,59	13
Цитоплазма	NTBF	Maxis	2	0,41	13
Цитоплазма	NTBF	Maxis	2	0,58	13
Мембрана	ETBF	Maxis	1	0,73	13
Мембрана	ETBF	Maxis	1	0,48	13
Мембрана	ETBF	Maxis	1	0,72	13
Мембрана	NTBF	Maxis	1	0,81	13
Мембрана	NTBF	Maxis	1	0,89	13
Мембрана	NTBF	Maxis	1	1,89	13
Мембрана	ETBF	Maxis	2	0,75	13
Мембрана	ETBF	Maxis	2	0,49	13
Мембрана	ETBF	Maxis	2	0,53	13
Мембрана	ETBF	Maxis	2	0,62	13
Мембрана	NTBF	Maxis	2	0,7	13
Мембрана	NTBF	Maxis	2	0,47	13
Мембрана	NTBF	Maxis	2	0,74	13
Мембрана	NTBF	Maxis	2	0,81	13
Тотал	ETBF	Maxis	1	1,1	13
Тотал	ETBF	Maxis	1	0,32	13
Тотал	ETBF	Maxis	1	0,71	13
Тотал	NTBF	Maxis	1	0,53	13
Тотал	NTBF	Maxis	1	0,48	13
Тотал	NTBF	Maxis	1	0,73	13
Тотал	NTBF	Maxis	1	0,7	13
Везикулы	ETBF	TTOF	1	1,33	13
Везикулы	NTBF	TTOF	1	1,66	13
Везикулы	ETBF	TTOF	2	1,23	13
Везикулы	NTBF	TTOF	2	2,43	13
Везикулы	ETBF	TTOF	3	1,57	13
Везикулы	NTBF	TTOF	3	1,93	13
Везикулы	ETBF	Maxis	1	0,9	13
Везикулы	ETBF	Maxis	1	0,77	13
Везикулы	ETBF	Maxis	2	0,59	13
Везикулы	ETBF	Maxis	2	0,82	13
Везикулы	NTBF	Maxis	1	1,51	13
Везикулы	NTBF	Maxis	1	0,55	13
Везикулы	NTBF	Maxis	2	0,75	13
Везикулы	NTBF	Maxis	2	0,92	13

**8.3 Распределение белков, идентифицированных в везикулах, согласно субклеточному происхождению. В столбцах ETBF и NTBF индикатор - 1 соответствуют наличию, а индикатор – 0 - отсутствию белка в списке идентификации**

Ген	Название белка	Клет.локализация	ETBF	NTBF
VU15_RS06855	2-oxoisovalerate dehydrogenase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS04470	30S ribosomal protein S1	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS19170	30S ribosomal protein S13	Cytoplasmic	1	0
rpsP	30S ribosomal protein S16	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS18045	30S ribosomal protein S2	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS19160	30S ribosomal protein S4	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS19200	30S ribosomal protein S5	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS19215	30S ribosomal protein S8	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS08735	3-phosphoglycerate dehydrogenase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS17195	4-alpha-glucanotransferase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS20235	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS19355	50S ribosomal protein L1	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS19360	50S ribosomal protein L11	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS19190	50S ribosomal protein L15	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS19250	50S ribosomal protein L16	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS19150	50S ribosomal protein L17	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS01985	50S ribosomal protein L19	Cytoplasmic	1	0
rplB	50S ribosomal protein L2	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS05225	50S ribosomal protein L25	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS07885	6-phosphogluconate dehydrogenase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS16825	aconitate hydratase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS15075	acyl-CoA dehydrogenase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS03920	alpha-1,3-galactosidase B	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS12240	alpha-glucan phosphorylase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS05615	aminomethyltransferase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS15305	AraC family transcriptional regulator	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS06365	aspartate aminotransferase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS12270	ATP synthase subunit A	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS20105	butyrate kinase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS16815	citrate synthase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS16520	diaminopimelate dehydrogenase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS13195	diphosphate--fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS12825	DNA polymerase III subunit beta	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS05750	DNA polymerase sliding clamp subunit	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS20510	DNA-binding protein HU-beta	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS19155	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	Cytoplasmic	1	0
rpoB	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS19335	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	Cytoplasmic	1	0
fusA	elongation factor G	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS17280	elongation factor G	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS18040	elongation factor Ts	Cytoplasmic	1	0
tuf	elongation factor Tu	Cytoplasmic	1	1
eno	enolase	Cytoplasmic	1	1
sufC	Fe-S cluster assembly ATPase SufC	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS13940	fructose-bisphosphate aldolase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS14735	fructose-bisphosphate aldolase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS06980	galactokinase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS01980	glucokinase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS13275	glucosamine-6-phosphate deaminase	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS17105	glucose-6-phosphate isomerase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS01515	glutamate decarboxylase	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS01520	glutaminase	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS04125	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS06230	histidine decarboxylase	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS10280	hypothetical protein	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS04585	hypothetical protein	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS10275	hypothetical protein	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS08415	hypothetical protein	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS15345	hypothetical protein	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS08740	hypothetical protein	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS03255	hypothetical protein	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS00280	hypothetical protein	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS06910	hypothetical protein	Cytoplasmic	0	1
VU15_RS17895	malate dehydrogenase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS04150	membrane protein	Cytoplasmic	1	1

VU15_RS09270	membrane protein	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS06780	membrane protein	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS13970	membrane protein	Cytoplasmic	0	1
VU15_RS14685	methylmalonyl-CoA carboxyltransferase	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS17050	methylmalonyl-CoA mutase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS05265	molecular chaperone ClpB	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS05350	molecular chaperone DnaK	Cytoplasmic	1	1
groEL	molecular chaperone GroEL	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS15175	molecular chaperone GroES	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS08695	Na <sup>+</sup> -translocating NADH-quinone reductase subunit A	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS00500	nitroreductase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS12940	non-heme ferritin	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS08080	oxaloacetate decarboxylase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS00190	peptidase	Cytoplasmic	0	1
VU15_RS09260	peptidase M10	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS18855	peptidase M13	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS14755	peptidase M48	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS05610	peptidase T	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS16010	peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS09835	peroxidase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS14250	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS12785	phosphate starvation protein PhoH	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS09825	phosphodiesterase	Cytoplasmic	1	1
pgk	phosphoglycerate kinase	Cytoplasmic	1	1
gpmA	phosphoglyceromutase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS20240	phospholipase	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS08730	phosphoserine aminotransferase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS13650	pirin	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS20065	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Cytoplasmic	1	1
secA	protein translocase subunit SecA	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS13990	pullulanase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS06245	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS20815	pyruvate kinase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS14885	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS17190	ribonucleoside-diphosphate reductase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS09685	ribose-phosphate pyrophosphokinase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS18070	ribosomal large subunit pseudouridine synthase B	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS18845	rod shape-determining protein MreB	Cytoplasmic	1	0
sucC	succinyl-CoA ligase subunit beta	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS13920	sulfatase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS12010	thioredoxin	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS13565	thioredoxin	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS04440	thioredoxin reductase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS19365	transcription termination/antitermination factor NusG	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS17270	transcriptional regulator	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS12095	transcriptional regulator	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS06975	transketolase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS00655	translation initiation factor IF-2	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS17750	triosephosphate isomerase	Cytoplasmic	1	1
VU15_RS10660	universal stress protein	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS20210	Xaa-Pro aminopeptidase	Cytoplasmic	1	0
VU15_RS03240	cell division protein FtsH	Cytoplasmic Membrane	1	0
VU15_RS16755	flagellar motor protein MotA	Cytoplasmic Membrane	1	1
VU15_RS05940	hypothetical protein	Cytoplasmic Membrane	1	1
VU15_RS10550	MexE family multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	Cytoplasmic Membrane	1	0
VU15_RS21135	peptidase S41	Cytoplasmic Membrane	1	1
VU15_RS20275	peptidase S41	Cytoplasmic Membrane	1	1
VU15_RS20535	preprotein translocase subunit SecD	Cytoplasmic Membrane	1	0
sdhA	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	Cytoplasmic Membrane	1	0
VU15_RS12230	thiol:disulfide interchange protein	Cytoplasmic Membrane	1	1
VU15_RS13775	thiol:disulfide interchange protein	Cytoplasmic Membrane	0	1
VU15_RS02985	aminopeptidase	Extracellular	1	1
VU15_RS05725	endoglycosidase	Extracellular	1	1
VU15_RS00555	hypothetical protein	Extracellular	1	1
VU15_RS13840	hypothetical protein	Extracellular	1	1
VU15_RS01765	hypothetical protein	Extracellular	1	1
VU15_RS14765	hypothetical protein	Extracellular	1	1
VU15_RS20560	hypothetical protein	Extracellular	1	0
VU15_RS06595	hypothetical protein	Extracellular	1	0
VU15_RS16205	hypothetical protein	Extracellular	1	0
VU15_RS10365	lipoprotein	Extracellular	1	1
VU15_RS05890	alpha-2-macroglobulin	Outer Membrane	1	1
VU15_RS04960	alpha-xylosidase	Outer Membrane	1	1
VU15_RS15080	beta-galactosidase	Outer Membrane	1	1

VU15_RS06615	cell surface protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS21415	ferrichrome-iron receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS07105	hypothetical protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS16195	hypothetical protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS16250	hypothetical protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS20485	hypothetical protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS19485	hypothetical protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS10290	hypothetical protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS16260	hypothetical protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS08090	hypothetical protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS09080	hypothetical protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS13825	hypothetical protein	Outer Membrane	1	0
VU15_RS06890	hypothetical protein	Outer Membrane	1	0
VU15_RS16245	hypothetical protein	Outer Membrane	1	0
VU15_RS03140	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS16190	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS01455	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS04155	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS01755	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS04145	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS09265	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS02630	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS07390	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS15355	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS07080	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS02010	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS04045	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS07330	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS04610	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS05595	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS20725	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS07120	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS05715	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS06105	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS02620	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS07325	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS06775	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS18175	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS14775	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS08100	membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS16995	membrane protein	Outer Membrane	1	0
VU15_RS01020	membrane protein	Outer Membrane	1	0
VU15_RS07455	membrane protein	Outer Membrane	1	0
VU15_RS08215	membrane protein	Outer Membrane	1	0
VU15_RS03510	membrane protein	Outer Membrane	0	1
VU15_RS16960	membrane protein	Outer Membrane	0	1
VU15_RS03005	membrane protein	Outer Membrane	0	1
VU15_RS20685	membrane protein	Outer Membrane	0	1
VU15_RS02625	membrane protein	Outer Membrane	0	1
VU15_RS08200	membrane protein	Outer Membrane	0	1
VU15_RS09105	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS12070	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS02245	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS21175	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS12025	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS04825	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS20490	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS08595	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS10895	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS10885	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS02180	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	1
VU15_RS14380	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	0
VU15_RS08210	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	1	0
VU15_RS01195	TonB-dependent receptor	Outer Membrane	0	1
VU15_RS04010	TonB-linked outer membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS04560	TonB-linked outer membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS04020	TonB-linked outer membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS15050	TonB-linked outer membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS19605	TonB-linked outer membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS21060	TonB-linked outer membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS13215	TonB-linked outer membrane protein	Outer Membrane	1	1
VU15_RS13975	TonB-linked outer membrane protein	Outer Membrane	0	1
VU15_RS19640	TonB-linked outer membrane protein	Outer Membrane	0	1
VU15_RS14805	transporter	Outer Membrane	1	1

VU15_RS10545	transporter	Outer Membrane	1	1
VU15_RS19090	transporter	Outer Membrane	0	1
VU15_RS13285	xanthan lyase	Outer Membrane	1	1
VU15_RS07685	2', 3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase	Periplasmic	0	1
VU15_RS07475	alkaline phosphatase	Periplasmic	0	1
VU15_RS05195	alpha-glucosidase	Periplasmic	1	1
VU15_RS15030	aminopeptidase	Periplasmic	1	1
VU15_RS20265	beta-D-glucoside glucohydrolase	Periplasmic	1	1
VU15_RS01260	beta-D-glucoside glucohydrolase	Periplasmic	1	1
VU15_RS07385	beta-galactosidase	Periplasmic	1	1
VU15_RS09255	beta-hexosaminidase	Periplasmic	1	1
VU15_RS03045	beta-N-acetylhexosaminidase	Periplasmic	1	1
VU15_RS07375	beta-N-acetylhexosaminidase	Periplasmic	1	1
VU15_RS17145	beta-N-acetylhexosaminidase	Periplasmic	1	0
VU15_RS07365	beta-N-acetylhexosaminidase	Periplasmic	1	0
VU15_RS17375	glutathione peroxidase	Periplasmic	1	1
VU15_RS10655	hypothetical protein	Periplasmic	1	1
VU15_RS12060	hypothetical protein	Periplasmic	1	0
VU15_RS19450	hypothetical protein	Periplasmic	1	0
VU15_RS19745	hypothetical protein	Periplasmic	1	0
ansB	L-asparaginase	Periplasmic	1	1
VU15_RS12435	lipid hydroperoxide peroxidase	Periplasmic	1	1
VU15_RS06265	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	Periplasmic	1	1
VU15_RS04360	peptidase M16	Periplasmic	1	1
VU15_RS18350	peptidylprolyl isomerase	Periplasmic	1	1
VU15_RS19580	sialidase	Periplasmic	1	1
VU15_RS07340	sialidase	Periplasmic	1	1
VU15_RS11000	superoxide dismutase	Periplasmic	1	1
VU15_RS12355	type I deoxyribonuclease HsdR	Periplasmic	1	1
VU15_RS19345	50S ribosomal protein L7/L12	Unknown	1	1
VU15_RS04595	alkaline phosphatase	Unknown	0	1
VU15_RS07380	alpha-1 2-mannosidase	Unknown	1	1
VU15_RS03165	alpha-1 2-mannosidase	Unknown	1	0
VU15_RS13905	alpha-1,3/4-fucosidase	Unknown	1	1
VU15_RS03300	alpha-2-macroglobulin	Unknown	1	1
VU15_RS14715	alpha-amylase	Unknown	1	1
VU15_RS14760	alpha-amylase	Unknown	1	1
VU15_RS00770	alpha-galactosidase	Unknown	1	1
VU15_RS20370	alpha-galactosidase	Unknown	0	1
VU15_RS03760	alpha-L-fucosidase	Unknown	1	1
VU15_RS15245	alpha-mannosidase	Unknown	1	0
VU15_RS03145	alpha-mannosidase	Unknown	1	0
VU15_RS06555	arylsulfatase	Unknown	1	0
VU15_RS06825	ATP-binding protein	Unknown	1	1
VU15_RS18080	beta-galactosidase	Unknown	1	1
VU15_RS13200	carbohydrate-binding protein	Unknown	1	1
VU15_RS07025	cell division protein	Unknown	1	1
VU15_RS13205	chitinase	Unknown	1	1
VU15_RS16985	chitinase	Unknown	1	0
VU15_RS17020	choloylglycine hydrolase	Unknown	1	1
VU15_RS14400	choloylglycine hydrolase	Unknown	1	1
VU15_RS12340	clostripain	Unknown	1	1
VU15_RS06850	diapophytoene dehydrogenase	Unknown	1	0
VU15_RS16200	endo-beta-N-acetylglucosaminidase	Unknown	1	0
VU15_RS05735	exo-alpha-sialidase	Unknown	1	1
VU15_RS11990	flavodoxin	Unknown	1	0
nagB	glucosamine-6-phosphate deaminase	Unknown	1	0
VU15_RS21055	glycan metabolism protein RagB	Unknown	1	1
VU15_RS16320	glycan metabolism protein RagB	Unknown	1	0
VU15_RS11860	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	Unknown	1	1
VU15_RS15060	glycoside hydrolase family 29	Unknown	1	0
VU15_RS20715	glycoside hydrolase family 95	Unknown	1	1
VU15_RS03960	glycosyl hydrolase family 109 protein 1	Unknown	1	1
VU15_RS11785	heat-shock protein	Unknown	1	0
VU15_RS06895	hemin receptor	Unknown	1	1
VU15_RS05500	hemolysin	Unknown	1	1
VU15_RS05495	hemolysin	Unknown	1	1
VU15_RS11050	histidine kinase	Unknown	1	1
VU15_RS18110	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS01070	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS10285	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS03305	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS05935	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS03765	hypothetical protein	Unknown	1	1

VU15_RS18150	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS15350	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS12430	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS06610	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS04115	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS07910	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS21170	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS05325	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS21215	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS06880	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS16325	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS00955	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS05945	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS04295	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS05460	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS16920	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS05130	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS02600	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS02615	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS12345	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS16240	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS08600	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS06790	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS05465	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS05505	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS05490	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS16265	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS16685	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS02655	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS06070	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS06830	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS09090	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS01895	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS13700	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS13345	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS16930	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS05720	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS05730	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS09565	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS13540	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS06115	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS09715	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS09100	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS09075	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS13830	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS05860	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS04680	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS04820	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS07110	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS02030	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS02025	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS04615	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS16935	hypothetical protein	Unknown	1	1
VU15_RS04390	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS13820	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS08340	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS02810	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS06795	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS12330	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS16210	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS14430	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS14010	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS08405	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS01450	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS07750	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS10295	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS08240	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS19920	hypothetical protein	Unknown	1	0
VU15_RS11620	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS07140	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS06650	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS03925	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS20850	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS03705	hypothetical protein	Unknown	0	1

VU15_RS16335	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS15055	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS05770	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS12800	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS18975	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS17300	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS17440	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS05160	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS07730	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS16255	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS16270	hypothetical protein	Unknown	0	1
VU15_RS14835	lipoprotein	Unknown	1	1
VU15_RS03200	lytic transglycosylase	Unknown	1	1
VU15_RS01885	malate dehydrogenase	Unknown	1	0
VU15_RS07280	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS07290	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS19610	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS07395	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS04005	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS04050	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS02015	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS01750	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS10300	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS16925	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS01745	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS01270	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS07335	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS19460	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS01265	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS02650	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS20675	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS20730	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS07315	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS02640	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS14770	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS02645	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS13210	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS07320	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS08085	membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS07285	membrane protein	Unknown	1	0
VU15_RS07295	membrane protein	Unknown	1	0
VU15_RS16990	membrane protein	Unknown	1	0
VU15_RS01025	membrane protein	Unknown	1	0
VU15_RS10830	membrane protein	Unknown	1	0
VU15_RS04140	membrane protein	Unknown	1	0
VU15_RS11700	membrane protein	Unknown	0	1
VU15_RS19645	membrane protein	Unknown	0	1
VU15_RS07490	metallophosphatase	Unknown	1	1
VU15_RS05570	N-acetylgalactosamine 6-sulfatase	Unknown	1	1
VU15_RS16285	NAD-specific glutamate dehydrogenase	Unknown	1	0
VU15_RS17085	patatin	Unknown	1	0
VU15_RS16330	peptidase	Unknown	1	1
VU15_RS05820	peptidase	Unknown	0	1
VU15_RS06190	peptidase C69	Unknown	1	1
VU15_RS11680	peptidase M23	Unknown	1	1
VU15_RS21630	peptidase S41	Unknown	1	1
VU15_RS13545	peptidase S46	Unknown	1	1
VU15_RS04185	peptidase S9	Unknown	1	1
VU15_RS15250	peptidase S9	Unknown	0	1
VU15_RS20960	peptidylprolyl isomerase	Unknown	1	1
VU15_RS06900	perforin protein	Unknown	1	1
VU15_RS20670	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	Unknown	1	1
VU15_RS00050	prolyl tripeptidyl peptidase	Unknown	1	1
VU15_RS10770	protease	Unknown	1	1
VU15_RS18000	serine protease	Unknown	1	1
VU15_RS07355	sialate O-acetyltransferase	Unknown	1	1
VU15_RS20830	tetratricopeptide repeat protein	Unknown	1	1
VU15_RS17965	thiol:disulfide interchange protein	Unknown	1	1
VU15_RS07260	TonB-linked outer membrane protein	Unknown	1	1
VU15_RS07310	TonB-linked outer membrane protein	Unknown	1	1

**8.4 Ферменты, идентифицированные в везикулах. В столбцах ETBF и NTBF индикатор - “1” соответствуют наличию, а индикатор “0” - отсутствию белка в списке идентификации**

Ген	Название белка	Класс фермента	ETBF	NTBF
VU15_RS01520	glutaminase	Hydrolases	1	1
VU15_RS14755	peptidase M48	Hydrolases	1	1
VU15_RS09825	phosphodiesterase	Hydrolases	1	1
VU15_RS20240	phospholipase	Hydrolases	1	1
VU15_RS20275	peptidase S41	Hydrolases	1	1
VU15_RS21135	peptidase S41	Hydrolases	1	1
VU15_RS02985	aminopeptidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS05725	endoglycosidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS15080	beta-galactosidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS04960	alpha-xylosidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS07340	sialidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS19580	sialidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS07385	beta-galactosidase	Hydrolases	1	1
ansB	L-asparaginase	Hydrolases	1	1
VU15_RS20265	beta-D-glucoside glucohydrolase	Hydrolases	1	1
VU15_RS01260	beta-D-glucoside glucohydrolase	Hydrolases	1	1
VU15_RS09255	beta-hexosaminidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS07375	beta-N-acetylhexosaminidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS03045	beta-N-acetylhexosaminidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS05195	alpha-glucosidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS15030	aminopeptidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS06265	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS04360	peptidase M16	Hydrolases	1	1
VU15_RS11860	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	Hydrolases	1	1
VU15_RS13905	alpha-1,3/4-fucosidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS03760	alpha-L-fucosidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS17020	choloylglycine hydrolase	Hydrolases	1	1
VU15_RS14400	choloylglycine hydrolase	Hydrolases	1	1
VU15_RS00770	alpha-galactosidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS18080	beta-galactosidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS07380	alpha-1 2-mannosidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS14760	alpha-amylase	Hydrolases	1	1
VU15_RS14715	alpha-amylase	Hydrolases	1	1
VU15_RS03145	alpha-mannosidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS13205	chitobiase	Hydrolases	1	1
VU15_RS05735	exo-alpha-sialidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS07490	metallophosphatase	Hydrolases	1	1
VU15_RS05570	N-acetylgalactosamine 6-sulfatase	Hydrolases	1	1
VU15_RS16330	peptidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS06190	peptidase C69	Hydrolases	1	1
VU15_RS11680	peptidase M23	Hydrolases	1	1
VU15_RS21630	peptidase S41	Hydrolases	1	1
VU15_RS13545	peptidase S46	Hydrolases	1	1
VU15_RS04185	peptidase S9	Hydrolases	1	1
VU15_RS00050	prolyl tripeptidyl peptidase	Hydrolases	1	1
VU15_RS10770	protease	Hydrolases	1	1
VU15_RS18000	serine protease	Hydrolases	1	1
VU15_RS07355	sialate O-acetyltransferase	Hydrolases	1	1
VU15_RS17750	triosephosphate isomerase	Isomerases	1	1
VU15_RS13275	glucosamine-6-phosphate deaminase	Isomerases	1	1
VU15_RS18350	peptidylprolyl isomerase	Isomerases	1	1
VU15_RS20960	peptidylprolyl isomerase	Isomerases	1	1
VU15_RS01515	glutamate decarboxylase	Lyases	1	1
VU15_RS06230	histidine decarboxylase	Lyases	1	1
eno	enolase	Lyases	1	1
VU15_RS13285	xanthan lyase	Lyases	1	1
VU15_RS20670	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	Lyases	1	1
VU15_RS03200	lytic transglycosylase	Lyases	1	1
VU15_RS04125	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Oxidoreductases	1	1
VU15_RS17375	glutathione peroxidase	Oxidoreductases	1	1
VU15_RS12435	lipid hydroperoxide peroxidase	Oxidoreductases	1	1
VU15_RS11000	superoxide dismutase	Oxidoreductases	1	1
pgk	phosphoglycerate kinase	Transferases	1	1
VU15_RS20065	polyribonucleotide	Transferases	1	1

	nucleotidyltransferase			
VU15_RS06855	2-oxoisovalerate dehydrogenase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS03920	alpha-1,3-galactosidase B	Hydrolases	1	0
VU15_RS09260	peptidase M10	Hydrolases	1	0
VU15_RS18855	peptidase M13	Hydrolases	1	0
VU15_RS05610	peptidase T	Hydrolases	1	0
VU15_RS13990	pullulanase	Hydrolases	1	0
VU15_RS13920	sulfatase	Hydrolases	1	0
VU15_RS20210	Xaa-Pro aminopeptidase	Hydrolases	1	0
VU15_RS17145	beta-N-acetylhexosaminidase	Hydrolases	1	0
VU15_RS07365	beta-N-acetylhexosaminidase	Hydrolases	1	0
VU15_RS15060	glycoside hydrolase family 29	Hydrolases	1	0
VU15_RS20715	glycoside hydrolase family 95	Hydrolases	1	0
VU15_RS03165	alpha-1 2-mannosidase	Hydrolases	1	0
VU15_RS15245	alpha-mannosidase	Hydrolases	1	0
VU15_RS06555	arylsulfatase	Hydrolases	1	0
VU15_RS16985	chitinase	Hydrolases	1	0
VU15_RS16200	endo-beta-N-acetylglucosaminidase	Hydrolases	1	0
VU15_RS03960	glycosyl hydrolase family 109 protein	Hydrolases	1	0
VU15_RS17105	glucose-6-phosphate isomerase	Isomerases	1	0
VU15_RS17050	methylmalonyl-CoA mutase	Isomerases	1	0
nagB	glucosamine-6-phosphate deaminase	Isomerases	1	0
VU15_RS14735	fructose-bisphosphate aldolase	Lyases	1	0
VU15_RS16825	aconitate hydratase	Lyases	1	0
VU15_RS08080	oxaloacetate decarboxylase	Lyases	1	0
VU15_RS13940	fructose-bisphosphate aldolase	Lyases	1	0
VU15_RS17895	malate dehydrogenase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS07885	6-phosphogluconate dehydrogenase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS04440	thioredoxin reductase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS17190	ribonucleoside-diphosphate reductase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS16520	diaminopimelate dehydrogenase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS20235	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS14885	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS15075	acyl-CoA dehydrogenase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS00500	nitroreductase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS16010	peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS09835	peroxidase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS06245	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS01885	malate dehydrogenase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS16285	NAD-specific glutamate dehydrogenase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS06850	diapophytoene dehydrogenase	Oxidoreductases	1	0
VU15_RS05615	aminomethyltransferase	Transferases	1	0
VU15_RS06975	transketolase	Transferases	1	0
VU15_RS12240	alpha-glucan phosphorylase	Transferases	1	0
VU15_RS17195	4-alpha-glucanotransferase	Transferases	1	0
VU15_RS08730	phosphoserine aminotransferase	Transferases	1	0
VU15_RS01980	glucokinase	Transferases	1	0
VU15_RS06980	galactokinase	Transferases	1	0
VU15_RS20815	pyruvate kinase	Transferases	1	0
VU15_RS13195	dip--fru-6-1 phosphotransferase	Transferases	1	0
VU15_RS20105	butyrate kinase	Transferases	1	0
VU15_RS09685	ribose-phosphate pyrophosphokinase	Transferases	1	0
VU15_RS16815	citrate synthase	Transferases	1	0
gpmA	phosphoglyceromutase	Transferases	1	0
VU15_RS06365	aspartate aminotransferase	Transferases	1	0
VU15_RS14685	CH3malonyl-CoA carboxyltransferase	Transferases	1	0
VU15_RS18070	ribosomal large subunit pseudouridine synthase B	Transferases	1	0
VU15_RS11050	histidine kinase	Transferases	1	0
VU15_RS07475	alkaline phosphatase	Hydrolases	0	1
VU15_RS07685	2', 3'-c- nucleotide 2'phosphodiesterase	Hydrolases	0	1
VU15_RS20370	alpha-galactosidase	Hydrolases	0	1
VU15_RS04595	alkaline phosphatase	Hydrolases	0	1
VU15_RS00190	peptidase	Hydrolases	0	1
VU15_RS05820	peptidase	Hydrolases	0	1
VU15_RS12355	type I deoxyribonuclease HsdR	Hydrolases	0	1
VU15_RS15250	peptidase S9	Hydrolases	0	1
VU15_RS14685	methylmalonyl-CoA	Isomerases	0	1

	carboxyltransferase			
VU15_RS11050	histidine kinase	Transferases	0	1

**8.5** Распределение белков везикул согласно функции. В столбцах ETBF и NTBF индикатор - “1” соответствуют наличию, а индикатор “0” - отсутствию белка в списке идентификации

Ген	Название белка	Функция	ETBF	NTBF
VU15_RS01515	glutamate decarboxylase	Amino acids metabolism	1	1
VU15_RS07685	2', 3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase	Purine/Pyrimidine metabolism	0	1
VU15_RS06855	2-oxoisovalerate dehydrogenase	Amino acids metabolism	1	0
VU15_RS04470	30S ribosomal protein S1	Ribosome	1	0
VU15_RS19170	30S ribosomal protein S13	Ribosome	1	0
rpsP	30S ribosomal protein S16	Ribosome	1	0
VU15_RS18045	30S ribosomal protein S2	Ribosome	1	0
VU15_RS19160	30S ribosomal protein S4	Ribosome	1	0
VU15_RS19200	30S ribosomal protein S5	Ribosome	1	0
VU15_RS19215	30S ribosomal protein S8	Ribosome	1	0
VU15_RS08735	3-phosphoglycerate dehydrogenase	Amino acids metabolism	1	0
VU15_RS17195	4-alpha-glucanotransferase	Carbohydrate metabolism	1	0
VU15_RS20235	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	Terpenoid backbone biosynthesis	1	0
VU15_RS19355	50S ribosomal protein L1	Ribosome	1	0
VU15_RS19360	50S ribosomal protein L11	Ribosome	1	0
VU15_RS19190	50S ribosomal protein L15	Ribosome	1	0
VU15_RS19250	50S ribosomal protein L16	Ribosome	1	0
VU15_RS19150	50S ribosomal protein L17	Ribosome	1	0
VU15_RS01985	50S ribosomal protein L19	Ribosome	1	0
rplB	50S ribosomal protein L2	Ribosome	1	0
VU15_RS05225	50S ribosomal protein L25	Ribosome	1	0
VU15_RS19345	50S ribosomal protein L7/L12	Ribosome	1	1
VU15_RS07885	6-phosphogluconate dehydrogenase	Pentose phosphate pathway	1	0
VU15_RS16825	aconitate hydratase	Citrate cycle	1	0
VU15_RS15075	acyl-CoA dehydrogenase	Citrate cycle	1	0
VU15_RS07475	alkaline phosphatase	Cofactors metabolism	0	1
VU15_RS04595	alkaline phosphatase	Cofactors metabolism	0	1
VU15_RS07380	alpha-1 2-mannosidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS03165	alpha-1 2-mannosidase	Carbohydrate metabolism	1	0
VU15_RS13905	alpha-1,3/4-fucosidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS03920	alpha-1,3-galactosidase B	Carbohydrate metabolism	1	0
VU15_RS05890	alpha-2-macroglobulin	Complement and coagulation cascades	1	1
VU15_RS03300	alpha-2-macroglobulin	Complement and coagulation cascades	1	1
VU15_RS14715	alpha-amylase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS14760	alpha-amylase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS00770	alpha-galactosidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS20370	alpha-galactosidase	Carbohydrate metabolism	0	1
VU15_RS12240	alpha-glucan phosphorylase	Carbohydrate metabolism	1	0
VU15_RS05195	alpha-glucosidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS03760	alpha-L-fucosidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS15245	alpha-mannosidase	Carbohydrate metabolism	1	0
VU15_RS03145	alpha-mannosidase	Carbohydrate metabolism	1	0
VU15_RS04960	alpha-xylosidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS05615	aminomethyltransferase	Amino acids metabolism	1	0
VU15_RS02985	aminopeptidase	peptidase	1	1
VU15_RS15030	aminopeptidase	peptidase	1	1
VU15_RS15305	AraC family transcriptional regulator	Purine/Pyrimidine metabolism	1	1
VU15_RS06555	arylsulfatase	peptidase	1	0
VU15_RS06365	aspartate aminotransferase	Amino acids metabolism	1	0
VU15_RS12270	ATP synthase subunit A	Another function	1	0
VU15_RS06825	ATP-binding protein	Another function	1	1
VU15_RS20265	beta-D-glucoside glucohydrolase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS01260	beta-D-glucoside glucohydrolase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS18080	beta-galactosidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS15080	beta-galactosidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS07385	beta-galactosidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS09255	beta-hexosaminidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS03045	beta-N-acetylhexosaminidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS07375	beta-N-acetylhexosaminidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS17145	beta-N-acetylhexosaminidase	Carbohydrate metabolism	1	0
VU15_RS07365	beta-N-acetylhexosaminidase	Carbohydrate metabolism	1	0

VU15_RS20105	butyrate kinase	Another function	1	0
VU15_RS13200	carbohydrate-binding protein	membrane receptor	1	1
VU15_RS07025	cell division protein	Cell division	1	1
VU15_RS03240	cell division protein FtsH	Cell division	1	0
VU15_RS06615	cell surface protein	Another function	1	1
VU15_RS13205	chitinase	Another function	1	1
VU15_RS16985	chitinase	Another function	1	0
VU15_RS17020	choloylglycine hydrolase	Secondary bile acid biosynthesis	1	1
VU15_RS14400	choloylglycine hydrolase	Secondary bile acid biosynthesis	1	1
VU15_RS16815	citrate synthase	Citrate cycle	1	0
VU15_RS12340	clostripain	Amino acids metabolism	1	1
VU15_RS16520	diaminopimelate dehydrogenase	Amino acids metabolism	1	0
VU15_RS06850	diapophytoene dehydrogenase	Citrate cycle	1	0
VU15_RS13195	diphosphate--fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS12825	DNA polymerase III subunit beta	Purine/Pyrimidine metabolism	1	0
VU15_RS05750	DNA polymerase sliding clamp subunit	Purine/Pyrimidine metabolism	1	0
VU15_RS20510	DNA-binding protein HU-beta	Purine/Pyrimidine metabolism	1	1
VU15_RS19155	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	Purine/Pyrimidine metabolism	1	0
rpoB	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	Purine/Pyrimidine metabolism	1	0
VU15_RS19335	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	Purine/Pyrimidine metabolism	1	0
fusA	elongation factor G	Translation	1	1
VU15_RS17280	elongation factor G	Translation	1	0
VU15_RS18040	elongation factor Ts	Translation	1	0
tuf	elongation factor Tu	Translation	1	1
VU15_RS16200	endo-beta-N-acetylglucosaminidase	peptidase	1	0
VU15_RS05725	endoglycosidase	peptidase	1	1
eno	enolase	Glycolysis	1	1
VU15_RS05735	exo-alpha-sialidase	peptidase	1	1
VU15_RS21415	ferrichrome-iron receptor	membrane receptor	1	1
sufC	Fe-S cluster assembly ATPase SufC	membrane receptor	1	0
VU15_RS16755	flagellar motor protein MotA	Cell division	1	1
VU15_RS11990	flavodoxin	Carbohydrate metabolism	1	0
VU15_RS13940	fructose-bisphosphate aldolase	Glycolysis	1	0
VU15_RS14735	fructose-bisphosphate aldolase	Glycolysis	1	0
VU15_RS06980	galactokinase	Carbohydrate metabolism	1	0
VU15_RS01980	glucokinase	Glycolysis	1	0
VU15_RS13275	glucosamine-6-phosphate deaminase	Amino acids metabolism	1	1
nagB	glucosamine-6-phosphate deaminase	Amino acids metabolism	1	0
VU15_RS17105	glucose-6-phosphate isomerase	Glycolysis	1	0
VU15_RS01520	glutaminase	Amino acids metabolism	1	1
VU15_RS17375	glutathione peroxidase	Glutathione metabolism	1	1
VU15_RS21055	glycan metabolism protein RagB	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS16320	glycan metabolism protein RagB	Carbohydrate metabolism	1	0
VU15_RS04125	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis	1	1
VU15_RS11860	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	Glycerophospholipid metabolism	1	1
VU15_RS15060	glycoside hydrolase family 29	Carbohydrate metabolism	1	0
VU15_RS20715	glycoside hydrolase family 95	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS03960	glycosyl hydrolase family 109 protein 1	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS11785	heat-shock protein	RNA degradation	1	0
VU15_RS06895	hemin receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS05500	hemolysin	membrane receptor	1	1
VU15_RS05495	hemolysin	membrane receptor	1	1
VU15_RS06230	histidine decarboxylase	Amino acids metabolism	1	1
VU15_RS11050	histidine kinase	Amino acids metabolism	1	1
VU15_RS18110	hypothetical protein	Amino acids metabolism	1	1
VU15_RS10280	hypothetical protein	unknown function	1	1
VU15_RS04585	hypothetical protein	unknown function	1	1
VU15_RS10275	hypothetical protein	unknown function	1	1
VU15_RS08415	hypothetical protein	unknown function	1	1
VU15_RS15345	hypothetical protein	unknown function	1	1
VU15_RS05940	hypothetical protein	unknown function	1	1
VU15_RS00555	hypothetical protein	unknown function	1	1
VU15_RS13840	hypothetical protein	unknown function	1	1
VU15_RS01765	hypothetical protein	unknown function	1	1
VU15_RS14765	hypothetical protein	unknown function	1	1



VU15_RS13825	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS06890	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS16245	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS12060	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS19450	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS19745	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS04390	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS13820	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS08340	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS02810	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS06795	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS12330	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS16210	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS14430	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS14010	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS08405	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS01450	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS07750	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS10295	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS08240	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS19920	hypothetical protein	unknown function	1	0
VU15_RS06910	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS11620	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS07140	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS06650	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS03925	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS20850	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS03705	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS16335	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS15055	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS05770	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS12800	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS18975	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS17300	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS17440	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS05160	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS07730	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS16255	hypothetical protein	unknown function	0	1
VU15_RS16270	hypothetical protein	unknown function	0	1
ansB	L-asparaginase	Amino acids metabolism	1	1
VU15_RS12435	lipid hydroperoxide peroxidase	Glycerophospholipid metabolism	1	1
VU15_RS10365	lipoprotein	membrane receptor	1	1
VU15_RS14835	lipoprotein	membrane receptor	1	1
VU15_RS03200	lytic transglycosylase	virulence factor	1	1
VU15_RS17895	malate dehydrogenase	Citrate cycle	1	0
VU15_RS01885	malate dehydrogenase	Citrate cycle	1	0
VU15_RS04150	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS09270	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS06780	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS03140	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS16190	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS01455	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS04155	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS01755	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS04145	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS09265	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS02630	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS07390	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS15355	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS07080	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS02010	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS04045	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS07330	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS04610	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS05595	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS20725	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS07120	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS05715	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS06105	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS02620	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS07325	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS06775	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS18175	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS14775	membrane protein	membrane protein	1	1

VU15_RS08100	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS07280	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS07290	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS19610	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS07395	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS04005	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS04050	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS02015	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS01750	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS10300	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS16925	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS01745	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS01270	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS07335	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS19460	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS01265	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS02650	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS20675	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS20730	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS07315	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS02640	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS14770	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS02645	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS13210	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS07320	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS08085	membrane protein	membrane protein	1	1
VU15_RS16995	membrane protein	membrane protein	1	0
VU15_RS01020	membrane protein	membrane protein	1	0
VU15_RS07455	membrane protein	membrane protein	1	0
VU15_RS08215	membrane protein	membrane protein	1	0
VU15_RS07285	membrane protein	membrane protein	1	0
VU15_RS07295	membrane protein	membrane protein	1	0
VU15_RS16990	membrane protein	membrane protein	1	0
VU15_RS01025	membrane protein	membrane protein	1	0
VU15_RS10830	membrane protein	membrane protein	1	0
VU15_RS04140	membrane protein	membrane protein	1	0
VU15_RS13970	membrane protein	membrane protein	0	1
VU15_RS03510	membrane protein	membrane protein	0	1
VU15_RS16960	membrane protein	membrane protein	0	1
VU15_RS03005	membrane protein	membrane protein	0	1
VU15_RS20685	membrane protein	membrane protein	0	1
VU15_RS02625	membrane protein	membrane protein	0	1
VU15_RS08200	membrane protein	membrane protein	0	1
VU15_RS11700	membrane protein	membrane protein	0	1
VU15_RS19645	membrane protein	membrane protein	0	1
VU15_RS07490	metallophosphatase	Purine/Pyrimidine metabolism	1	1
VU15_RS14685	methylmalonyl-CoA carboxyltransferase	Propanoate metabolism	1	1
VU15_RS17050	methylmalonyl-CoA mutase	Amino acids metabolism	1	0
VU15_RS10550	MexE family multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	membrane receptor	1	0
VU15_RS05265	molecular chaperone ClpB	RNA degradation	1	1
VU15_RS05350	molecular chaperone DnaK	RNA degradation	1	1
groEL	molecular chaperone GroEL	RNA degradation	1	1
VU15_RS15175	molecular chaperone GroES	RNA degradation	1	0
VU15_RS08695	Na <sup>+</sup> -translocating NADH-quinone reductase subunit A	membrane protein	1	0
VU15_RS05570	N-acetylgalactosamine 6-sulfatase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS06265	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	Amino acids metabolism	1	1
VU15_RS16285	NAD-specific glutamate dehydrogenase	Amino acids metabolism	1	0
VU15_RS00500	nitroreductase	Pentose phosphate pathway	1	0
VU15_RS12940	non-heme ferritin	Another function	1	0
VU15_RS08080	oxaloacetate decarboxylase	Citrate cycle	1	0
VU15_RS17085	patatin	virulence factor	1	0
VU15_RS16330	peptidase	peptidase	1	1
VU15_RS00190	peptidase	peptidase	0	1
VU15_RS05820	peptidase	peptidase	0	1
VU15_RS06190	peptidase C69	peptidase	1	1
VU15_RS09260	peptidase M10	peptidase	1	0
VU15_RS18855	peptidase M13	peptidase	1	0
VU15_RS04360	peptidase M16	peptidase	1	1

VU15_RS11680	peptidase M23	peptidase	1	1
VU15_RS14755	peptidase M48	peptidase	1	1
VU15_RS21135	peptidase S41	peptidase	1	1
VU15_RS20275	peptidase S41	peptidase	1	1
VU15_RS21630	peptidase S41	peptidase	1	1
VU15_RS13545	peptidase S46	peptidase	1	1
VU15_RS04185	peptidase S9	peptidase	1	1
VU15_RS15250	peptidase S9	peptidase	0	1
VU15_RS05610	peptidase T	peptidase	1	0
VU15_RS16010	peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	Amino acids metabolism	1	0
VU15_RS18350	peptidylprolyl isomerase	Another function	1	1
VU15_RS20960	peptidylprolyl isomerase	Another function	1	1
VU15_RS06900	perforin protein	Another function	1	1
VU15_RS09835	peroxidase	Another function	1	0
VU15_RS14250	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	Another function	1	0
VU15_RS12785	phosphate starvation protein PhoH	Another function	1	0
VU15_RS09825	phosphodiesterase	Another function	1	1
VU15_RS20670	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	Glycolysis	1	1
pgk	phosphoglycerate kinase	Glycolysis	1	1
gpmA	phosphoglyceromutase	Glycolysis	1	0
VU15_RS20240	phospholipase	Glycolysis	1	1
VU15_RS08730	phosphoserine aminotransferase	Amino acids metabolism	1	0
VU15_RS13650	pirin	unknown function	1	0
VU15_RS20065	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Purine/Pyrimidine metabolism	1	1
VU15_RS20535	preprotein translocase subunit SecD	Protein export	1	0
VU15_RS00050	prolyl tripeptidyl peptidase	peptidase	1	1
VU15_RS10770	protease	peptidase	1	1
secA	protein translocase subunit SecA	Protein export	1	0
VU15_RS13990	pullulanase	peptidase	1	0
VU15_RS06245	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	Purine/Pyrimidine metabolism	1	0
VU15_RS20815	pyruvate kinase	Glycolysis	1	0
VU15_RS14885	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	Glycolysis	1	0
VU15_RS17190	ribonucleoside-diphosphate reductase	Purine/Pyrimidine metabolism	1	0
VU15_RS09685	ribose-phosphate pyrophosphokinase	Pentose phosphate pathway	1	0
VU15_RS18070	ribosomal large subunit pseudouridine synthase B	Ribosome	1	0
VU15_RS18845	rod shape-determining protein MreB	Cell division	1	0
VU15_RS18000	serine protease	Another function	1	1
VU15_RS07355	sialate O-acetyltransferase	Another function	1	1
VU15_RS19580	sialidase	Carbohydrate metabolism	1	1
VU15_RS07340	sialidase	Carbohydrate metabolism	1	1
sdhA	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	Citrate cycle	1	0
sucC	succinyl-CoA ligase subunit beta	Citrate cycle	1	0
VU15_RS13920	sulfatase	Another function	1	0
VU15_RS11000	superoxide dismutase	Another function	1	1
VU15_RS20830	tetratricopeptide repeat protein	Another function	1	1
VU15_RS12230	thiol:disulfide interchange protein	Another function	1	1
VU15_RS17965	thiol:disulfide interchange protein	Another function	1	1
VU15_RS13775	thiol:disulfide interchange protein	Another function	0	1
VU15_RS12010	thioredoxin	Another function	1	0
VU15_RS13565	thioredoxin	Another function	1	0
VU15_RS04440	thioredoxin reductase	Purine/Pyrimidine metabolism	1	0
VU15_RS09105	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS12070	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS02245	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS21175	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS12025	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS04825	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS20490	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS08595	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS10895	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS10885	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS02180	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	1
VU15_RS14380	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	0
VU15_RS08210	TonB-dependent receptor	membrane receptor	1	0
VU15_RS01195	TonB-dependent receptor	membrane receptor	0	1

VU15_RS04010	TonB-linked outer mem.protein	membrane receptor	1	1
VU15_RS04560	TonB-linked outer mem.protein	membrane receptor	1	1
VU15_RS04020	TonB-linked outer mem.protein	membrane receptor	1	1
VU15_RS15050	TonB-linked outer mem.protein	membrane receptor	1	1
VU15_RS19605	TonB-linked outer mem.protein	membrane receptor	1	1
VU15_RS21060	TonB-linked outer mem.protein	membrane receptor	1	1
VU15_RS13215	TonB-linked outer mem.protein	membrane receptor	1	1
VU15_RS07260	TonB-linked outer mem.protein	membrane receptor	1	1
VU15_RS07310	TonB-linked outer mem.protein	membrane receptor	1	1
VU15_RS13975	TonB-linked outer mem.protein	membrane receptor	0	1
VU15_RS19640	TonB-linked outer mem.protein	membrane receptor	0	1
VU15_RS19365	transcription termination/antitermination factor NusG	Purine/Pyrimidine metabolism	1	0
VU15_RS17270	transcriptional regulator	Purine/Pyrimidine metabolism	1	1
VU15_RS12095	transcriptional regulator	Purine/Pyrimidine metabolism	1	0
VU15_RS06975	transketolase	Pentose phosphate pathway	1	0
VU15_RS00655	translation initiation factor IF-2	Translation	1	0
VU15_RS14805	transporter	membrane receptor	1	1
VU15_RS10545	transporter	membrane receptor	1	1
VU15_RS19090	transporter	membrane receptor	0	1
VU15_RS17750	triosephosphate isomerase	Glycolysis	1	1
VU15_RS12355	type I deoxyribonuclease HsdR	Another function	1	1
VU15_RS10660	universal stress protein	RNA degradation	1	0
VU15_RS20210	Xaa-Pro aminopeptidase	Another function	1	0
VU15_RS13285	xanthan lyase	Another function	1	1

## 8.6 Генная структура островка патогенности ВОВ25 (ЕТВФ)

ID	Направление чтения	Начало гена	Конец гена
VU15_RS14290	-	3512374	3513216
VU15_RS14295	-	3513185	3514705
VU15_RS14300	-	3514925	3515152
VU15_RS14305	-	3515417	3515653
VU15_RS14310	-	3515656	3516600
VU15_RS14315	+	3517214	3517756
VU15_RS14320	+	3517746	3518696
VU15_RS14325	+	3518969	3519205
VU15_RS14330	-	3519603	3520820
VU15_RS14335	+	3521557	3521739
VU15_RS14340	+	3522485	3523675
VU15_RS14345	-	3524733	3526337
VU15_RS14350	-	3526416	3526769
VU15_RS14355	-	3526780	3529860
VU15_RS14360	-	3529984	3531291
VU15_RS14365	-	3531297	3531701
VU15_RS14370	+	3532259	3532855
VU15_RS14375	+	3532930	3533886
VU15_RS14380	+	3534030	3537413
VU15_RS14385	+	3537424	3539061
VU15_RS14390	+	3539159	3540718
VU15_RS14395	+	3541195	3541479
VU15_RS14400	-	3541792	3542871
VU15_RS14405	+	3543475	3543693
VU15_RS14410	-	3543816	3544657
VU15_RS14415	-	3544746	3544988
VU15_RS14420	+	3545486	3546298
VU15_RS14425	+	3546295	3546573
VU15_RS14430	+	3546643	3548484
VU15_RS14435	-	3548709	3550292
VU15_RS14440	-	3550306	3550614
VU15_RS14445	-	3550611	3550952
VU15_RS14450	-	3550936	3551487
VU15_RS14455	-	3551484	3552638
VU15_RS14460	+	3552723	3553157
VU15_RS14465	-	3553313	3554605
VU15_RS14470	-	3555155	3556135
VU15_RS14475	-	3556132	3556773
VU15_RS14480	-	3556793	3557566
VU15_RS14485	-	3557572	3558093
VU15_RS14490	-	3558106	3560526
VU15_RS14495	-	3560495	3560836
VU15_RS14500	-	3560833	3561141
VU15_RS14505	-	3561153	3561950
VU15_RS14510	-	3561969	3563573
VU15_RS14515	-	3563624	3564586
VU15_RS14520	-	3564604	3565485
VU15_RS14525	-	3565472	3567535
VU15_RS14530	-	3567547	3568089
VU15_RS14535	-	3568086	3568379
VU15_RS14540	-	3568590	3569105
VU15_RS14545	-	3569147	3569326
VU15_RS14550	-	3569407	3569667
VU15_RS14555	-	3569672	3569959
VU15_RS14560	-	3569956	3570303
VU15_RS14565	-	3570458	3571357
VU15_RS14570	-	3571520	3572629
VU15_RS14575	-	3572668	3573096
VU15_RS14580	-	3573557	3573838
VU15_RS14585	-	3573849	3573992
VU15_RS14590	-	3574084	3574401
VU15_RS14595	-	3574417	3574671
VU15_RS14600	-	3574689	3574907
VU15_RS14605	-	3574918	3575106

## 8.7 Метаболиты, идентифицированные в клетках и везикулах ETBF и NTBF методом ВЭЖХ-МС/МС

ID	Метаболит (режим положительных ионов)	Площадь пика на хром.кривой (ETBF клетки)	Площадь пика на хром.кривой (NTBF клетки)	m/z	Время выхода
C01005	3-Phospho serine	4277	9412	186.00>88.00	14.200
C00334	4-Aminobutyric acid	1700118,667	1400752,333	104.05>87.05	14.400
C01157	4-Hydroxy-Proline	588047,3333	276731,3333	132.05>86.05	13.500
C00147	Adenine	56049,33333	78883,33333	136.05>119.05	10.900
C00212	Adenosine	712955,6667	2629016	268.00>136.00	11.006
C00041	Alanine	611035,6667	420620,3333	90.05>44.05	13.600
C00020	AMP	259484	6146	348.05>136.05	11.900
C00062	Arginine	38536724,67	23945221,33	175.10>70.05	19.900
C00152	Asparagine	9398,333333	4362,333333	133.05>74.25	14.000
C00049	Aspartate	7624	924,3333333	134.05>74.00	13.900
C00487	Carnitine	80419	98155	162.10>103.05	15.400
C00327	Citrulline	68635	106373	176.10>159.05	13.900
C00055	CMP	16168,66667	7412,666667	324.00>112.00	14.300
C00300	Creatine	33513,66667	64041,66667	132.10>90.05	13.800
C00791	Creatinine	69663,66667	56034	114.05>86.05	12.000
C00475	Cytidine	7280	0	244.00>112.00	11.705
C00360	dAMP	26388,33333	30886,66667	332.00>136.00	13.900
C00559	Deoxyadenosine	5460	2958	253.00>137.00	10.800
C00117	dRibose-5-P	4594	6685	231.00>97.05	17.300
C00364	dTMP	8743,666667	6650,333333	323.00>81.00	13.600
C00016	FAD	7928,666667	10448	786.00>348.00	12.694
C00043	Glucosamine-P	592,6666667	8373,666667	260.00>162.00	22.000
C00025	Glutamate	814283	383484	148.05>130.05	13.400
C00064	Glutamine	9369114	15006718,67	147.00>84.00	14.111
C00037	Glycine	102326	79549,33333	76.00>30.00	13.600
C00144	GMP	7648,333333	3070,666667	364.00>152.00	13.900
C00242	Guanine	3982	2773,666667	152.05>135.05	11.300
C00387	Guanosine	2799,333333	1141,333333	284.00>135.00	11.539
C00262	Гипоксантин	4095	10447	137.05>119.05	10.300
C00130	IMP	17777	19870,33333	349.00>137.00	13.900
C00294	Inosine	82155,66667	263210,6667	269.00>137.00	11.009
C00123	Leucine	262529,6667	440853,6667	132.10>86.10	12.700
C00047	Lysine	492487,6667	769445	147.00>41.05	20.100
C00073	Methionine	174269,3333	214444,6667	150.05>104.05	12.900
C00437	N-Acetyl-ornithine	134109,3333	88987	175.00>115.00	18.300
C00003	NAD	119190	108706	664.00>428.05	13.800
C00003	NAD+	130082,3333	142309,6667	664.00>428.05	9.300
C00004	NADH	22523	16608	665.00>428.05	13.700
C00153	Nicotinamide	406316,6667	382849,6667	123.05>80.05	13.700
C01602	Ornithine	684024	755735	133.05>70.00	18.300
C00292	Phenylamine	596480	649019	166.05>120.10	12.800
C00148	Proline	2196474	2776558	116.05>70.05	13.600
C00100	Propanoyl-CoA	10517	6744	824.00>317.00	13.579
C00314	Pyridoxine	717774,3333	612094	170.00>134.00	10.500
C00255	Riboflavin	3603,333333	8969	377.00>243.00	10.600
C00019	S-Adenosil-L-methionine	511225,3333	276652,3333	399.00>250.00	0.001
C00065	Serine	18607	73411,33333	106.05>60.05	13.500
C00315	Spermidine	78225,33333	104001	146.65>129.15	12.000
C00378	Thiamine	7624	924,3333333	265.00>122.00	14.500
C00188	Threonine	93349	147091,3333	120.05>56.05	13.500
C00178	Thymine	21920	11357,66667	127.05>110.00	1,95
C00078	Tryptophan	72927,66667	92496,33333	205.10>146.05	12.566
C00082	Tyrosine	67661	57683	182.10>165.05	12.600
C00105	UMP	7389	4155,333333	325.00>97.00	13.800
C00299	Uridine	31231	24736	245.05>113.05	11.500
C00183	Valine	184480	488536	118.10>72.10	13.000
C01762	Xanthosine	0	17059	285.00>153.00	11.300
C00655	XMP	0	74500,66667	365.00>97.00	0.001
ID	Метаболит (режим отрицательных ионов)	Площадь пика на хром.кривой (ETBF клетки)	Площадь пика на хром.кривой (NTBF клетки)	m/z	Время выхода
C00631	2-phosphoglycerate	15869,33333	7648	185.00>97.00	13.900
C00227	Acetyl-P	7034,666667	982	139.00>79.00	13.800
C00008	ADP	5238,333333	12493,5	426.00>134.00	14.322
C00062	Arginine	2807999,667	2101484	173.10>131.00	19.329
C00002	ATP	987	0	506.00>408.00	13.838
C00158	citrate	39102	4144	191.00>111.00	25.010

C00055	CMP	5836	11083,33333	306.05>143.05	19.200
C00206	dADP	493	1234	410.00>79.00	13.300
C00705	dCDP	491	2945	386.00>159.00	14.100
C00672	Deoxyribose-P	7901	5080	213.00>79.00	14.100
C00361	dGDP	1480	0	426.00>159.00	14.100
C00362	dGMP	100272,3333	56345,66667	346.00>78.90	13.900
C00111	Dihydroxy-aceton-P/G-3-P3	13824,33333	5674	169.00>79.00	13.892
C00363	dTDP	247	3954	401.00>159.00	13.600
C00337	Dyhydroorotate	31356,33333	30765,33333	157.00>113.00	13.600
C00279	Erythrose-4-P	3701	0	199.00>138.90	14.300
C00122	Fumarate	75920,66667	101222,3333	115.00>71.00	10.200
C00257	Glucuronate	2220	0	195.00>129.00	1.500
C00043	Glucosamine-P	3510,5	5485	258.05>78.95	14.000
C00031	Glucose	27287	41317,66667	179.05>113.05	12.500
C00025	Glutamate	0	930100,6667	146.05>128.05	11.300
C00236	Glycerate-1,3-PP	2372,333333	2220	265.00>78.95	13.500
C00197	Glycerate-3-P/Glycerate-2-P	15705,66667	7648	185.00>97.00	12.580
C00093	Glycerol-P	320795,3333	115848,3333	171.00>96.95	13.800
C00668	Hexose-6-P	17587	13333,66667	259.00>79.00	13.778
C00149	Malate	65093,33333	37726,33333	133.00>115.00	13.800
C04256	N-acetyl-glucosamine-P	9989,5	3681	300.00>79.00	14.000
C00004	NADH	1472,5	2699,5	664.00>408.00	8.900
C00006	NADP	2863	2290,333333	742.00>620.00	8.900
C00295	Orotate	33814,33333	25173	155.00>111.00	11.440
C00074	Phosphoenolpyruvate	41446	175571	163.00>91.00	11.050
C00022	Pyruvate	7438,666667	12466,33333	87.00>43.00	13.975
C00117	Ribose-5P	46382,33333	14511,33333	229.00>138.90	13.800
C00042	Succinate	2554551,667	1391457	117.00>73.00	13.500
C00188	Threonine	292393,6667	286110,6667	118.00>74.00	13.500
C00078	Tryptophan	90485	98384,33333	203.10>116.05	13.500
C00015	UDP	11951	21253,33333	403.00>305.00	13.700
ID	Метаболит (режим положительных ионов)	Площадь пика на хром.кривой (ETBF везикулы)	Площадь пика на хром.кривой (NTBF везикулы)	m/z	Время выхода
C00334	4-Aminobutiric acid	670119,0564	403709,6583	104.05>87.05	14.400
C01157	4-Hydroxy-L-Proline	232075,2293	436759,0068	132.05>86.05	13.500
C00147	Adenine	826646,7547	1507322,945	136.05>119.05	10.900
C00212	Adenosine	167837,4578	1129878,912	268.00>136.00	11.006
C00041	Alanine	428218,4076	770658,2345	90.05>44.05	13.600
C00020	AMP	19204,6476	31395,19119	348.05>136.05	11.900
C00062	Arginine	23572949,76	41801375,53	175.10>70.05	19.900
C00049	Aspartate	15522,48377	21055,90662	134.05>74.00	13.900
C00327	Citrulline	135268,264	323040,6138	176.10>159.05	13.900
C00055	CMP	1888,293307	3142,378416	324.00>112.00	14.300
C00300	Creatine	146902,0033	204908,2389	132.10>90.05	13.800
C00791	Creatinine	1821280,738	3025077,927	114.05>86.05	12.000
C00475	Cytidine	176107,3843	315937,4673	244.00>112.00	11.705
C00016	FAD	877842,1077	1479786,038	786.00>348.00	12.694
C00025	Glutamate	408739,696	813016,7278	148.05>130.05	13.400
C00064	Glutamine	4930750,298	8702454,274	147.00>84.00	14.111
C00037	Glycine	46019,97401	104478,5862	76.00>30.00	13.600
C00144	GMP	3682,242311	13136,10088	364.00>152.00	13.900
C00387	Guanosine	147702,7788	346150,5378	284.00>135.00	11.539
C00135	Histidine	552678,6397	798218,4937	156.10>110.05	13.4
C00123	leucine	534066,2045	839244,3832	132.10>86.10	12.700
C00047	Lysine	926209,7887	1439508,568	147.00>41.05	20.100
C00644	mannitol	89208,165	121428,4905	181.05>71.00	11.44
C00073	Methionine	303273,6547	453787,1192	150.05>104.05	12.900
C00253	Nicotinic acid	20971,31595	24934,23664	124.05>106.05	14
C00077	Ornithine	3983617,035	5338355,376	133.05>70.00	18.300
C00079	Phenylalanine	980413,53	1476095,928	166.05>120.10	12.800
C00148	Proline	4754205,915	7668330,095	116.05>70.05	13.600
C00065	Serine	60214,38096	86263,75952	106.05>60.05	13.500
C00089	Sucrose	67579,13406	263893,4436	365.10>185.05	12.000
C00188	threonine	190706,2798	339675,7045	120.05>56.05	13.500
C00078	Tryptophane	212236,1129	308709,4417	205.10>146.05	12.566
C00082	Tyrosine	114766,7695	153834,7682	182.10>165.05	12.600
C00183	Valine	877842,1077	1479786,038	118.10>72.10	13.000
C01762	Xanthosine	66098,38663	148619,3285	285.00>153.00	11.300
ID	Метаболит (режим отрицательных ионов)	Площадь пика на хром.кривой (ETBF везикулы)	Площадь пика на хром.кривой (NTBF везикулы)	m/z	Время выхода

C00667	D-Hexose-6-P	384,8571429	866	259.00>79.00	13.800
C00337	Dyhydroorotate	13168,28571	16184,71429	157.00>113.00	11.500
C05378	Fructose-1,6-PP	2950,571429	6767,142857	339.00>97.00	13.800
C00122	Fumarate	9194,857143	21838,14286	115.00>71.00	1.500
C00257	Gluconate	9776,285714	4522,142857	195.00>129.00	13.300
C00031	Glucose	103865,7143	144656	179.05>113.05	11.300
C00197	Glycerate-2-P	3995	10575,85714	185.00>141.00	13.800
C00093	Glycerol-P	1029,857143	5859,714286	171.00>79.00	13.778
C00149	Malate	433308,1429	709005,8571	133.00>115.00	13.600
C00295	Orotate	4648,428571	7700	155.00>111.00	11.050
C00042	Succinate	38944,57143	107771	117.00>73.00	12.800
C00188	Threonine	15233,14286	34309,14286	118.00>74.00	13.700
C01083	Trehalose	1867,857143	7568,857143	341.00>179.00	12.279
C00078	Tryptophane	3307,714286	6727,285714	203.10>116.05	12.500
C00015	UDP	1717,428571	6645,857143	403.00>305.00	12.300

### 8.8 Метаболиты, идентифицированные в везикулах ЕТВФ и NTBF методом ГХ-МС. ЕТВФ1/NTBF1-ЕТВФ-7/NTBF7 – биологические повторы

Метаболит	1 ЕТВФ	2 ЕТВФ	3 ЕТВФ	4 ЕТВФ	5 ЕТВФ	6 ЕТВФ	7 ЕТВФ
3,4-dihydroxyphenylethanol (3TMS) (µg)	0,1169	0,017	0,0213	0,0145	0	0	0,0051
4-hydroxyphenylethanol (2TMS) (µg)	0,2709	0,1182	0	0,091	0,0094	0	0,0288
aC14:0 (1TMS) (µg)	0	0,0252	0,0237	0,7754	0	0	0,0049
aC15:0 (1TMS) (µg)	0	0,0182	0	0	0	0	0,0155
aC16:0 (1TMS) (µg)	0,013	0,4362	0,2417	1,6825	0	0	0,2208
aC18:0 (1TMS) (µg)	0,9316	0,3301	0,0215	0,1592	0	0	0,027
aC8:0 (1TMS) (µg)	0,0589	0,0755	0,0602	0,0257	0,0152	0,0104	0,0558
aC9:0 (1TMS) (µg)	0	0,0279	0,0786	0,0222	0	0	0,0353
benzoic acid (1TMS) (µg)	0,0978	0,1852	0,1793	0,1763	0,0274	0,0185	0,1275
fumaric acid (2TMS) (µg)	0	0,0118	0	0	0	0	0
glucose (5TMS) (µg)	0,2293	0,386	1,6603	0,3701	0	0	0,0426
lactic acid (2TMS) (µg)	1,787	2,5676	2,5678	11,891	0	0,1329	5,4686
MAG(0:0/16:0/0:0) (µg)	0,0121	0,0129	0	0	0	0	0
MAG(0:0/18:0/0:0) (µg)	0,0263	0,0484	0	0	0	0	0
MAG(16:0/0:0/0:0) (µg)	0,2182	2,4816	0,04	0	0	0	0
MAG(18:0/0:0/0:0) (µg)	0,3149	7,9565	0,0265	0	0	0	0
mannitol (6TMS) (µg)	0,0226	0,0477	0,1253	0,0104	0	0	0,0102
myo-inositol (µg)	0	0,0124	0,0269	0,0567	0	0	0,0122
N-acetyl GLY (µg)	0	0,2145	0,091	0,2366	0	0	0,3588
nC11 (µg)	0,3678	0,3093	0	0,314	0,2389	0,3236	0,7177
nC12 (µg)	0	0	15,338	0,0002	22,906	0	0,0009
nC13 (µg)	0,1868	0	0	0,1692	0,1519	0,1969	0,4275
nC14 (µg)	0,107	0,0943	0,052	0,1519	0	0,1246	0
orcinol (µg)	0,0396	0,1992	0,0694	0,2068	0	0	0,1777
p-methylbenzoic acid (1TMS) (µg)	0,034	0,1927	0,104	0,0951	0	0	0,1608
phosphate (3TMS) (µg)	0	1,8208	0	3,5998	0	0	1,1949
RI=1174 (µg)	0	0,1076	0	0,0822	0	0	0,2793
RI=1217 mw 217 (µg)	0	0,1484	0,0403	0,1454	0	0	0,2165
RI=1377 (µg)	0	0,0495	0	0,0542	0	0	0,0431
succinic acid (2TMS) (µg)	0	0,0716	0,0417	0	0	0	0,1288
Метаболит	1 NTBF	2 NTBF	3 NTBF	4 NTBF	5 NTBF	6 NTBF	7 NTBF
3,4-dihydroxyphenylethanol (3TMS) (µg)	0,0676	0,0293	0	0,0045	0	0	0
4-hydroxyphenylethanol (2TMS) (µg)	0,2064	0,2566	0,2702	0,1335	0	0	0,021
aC14:0 (1TMS) (µg)	0,0159	0,0166	0	0,0109	0	0	0,0029
aC15:0 (1TMS) (µg)	0	0,013	0	0,0138	0	0	0
aC16:0 (1TMS) (µg)	0,3621	0,2762	0	0,0813	0	0	0,1646
aC18:0 (1TMS) (µg)	0,0962	0,1636	0	0	0	0	0,0272
aC8:0 (1TMS) (µg)	0,0896	0,0234	0,0805	0,0152	0,012	0,003	0,0342
aC9:0 (1TMS) (µg)	0,0139	0,0297	0,0255	0,0163	0	0	0,0309
benzoic acid (1TMS) (µg)	0,0754	0,2214	0,7583	0,102	0,0137	0,0099	0,0946
fumaric acid (2TMS) (µg)	0,0317	0	0	0,0179	0	0	0
glucose (5TMS) (µg)	0,493	0,6975	1,179	0,2139	0	0	0,0422
lactic acid (2TMS) (µg)	2,2622	2,0074	2,471	5,1351	0,0365	0	6,6487
MAG(0:0/16:0/0:0) (µg)	0,0028	0	0	0	0	0	0
MAG(0:0/18:0/0:0) (µg)	0,0018	0,0061	0	0	0	0	0
MAG(16:0/0:0/0:0) (µg)	0,4442	0,7108	0	0	0	0	0
MAG(18:0/0:0/0:0) (µg)	0,5685	1,3321	0	0	0	0	0
mannitol (6TMS) (µg)	0,0455	0	0,0811	0,0379	0	0	0
myo-inositol (µg)	0	0,0126	0,0536	0	0	0	0,0241
N-acetyl GLY (µg)	0,4209	0,1938	0	0,105	0	0	0,1075
nC11 (µg)	0,4609	0,3485	0	0,259	0,2624	0,2504	0,3873
nC12 (µg)	0,0001	0	31,154	26,383	0	0	7E-05
nC13 (µg)	0,2326	0,1702	0	0	0,2141	0,2223	0,2109
nC14 (µg)	0,1407	0,1032	0,1086	0,0907	0,1433	0,1416	0,1271
orcinol (µg)	0,2685	0,1957	0,1233	0,1406	0	0	0,1379
p-methylbenzoic acid (1TMS) (µg)	0,1733	0,183	0	0,0829	0	0	0,1657

phosphate (3TMS) ( $\mu\text{g}$ )	0	1,4132	0	1,2962	0	0	0,7587
RI=1174 ( $\mu\text{g}$ )	0,1068	0,0907	0	0,0505	0	0	0
RI=1217 mw 217 ( $\mu\text{g}$ )	0,2282	0,1389	0	0,0725	0	0	0,0729
RI=1377 ( $\mu\text{g}$ )	0,0633	0,0439	0	0,0272	0	0	0,0275
succinic acid (2TMS) ( $\mu\text{g}$ )	0	0,0976	0	0,433	0	0	0,6004

## 8.9 Количественный анализ относительной представленности метаболитов в клетках и в везикулах ЕТВФ и NTBF

ID	Метаболиты ЕТВФ клеток (режим положительных ионов)	Площадь пика на хром.кривой (Pa)	Коэффициент (K) от максимума Pa	Log (K)
C00334	4-Aminobutyric acid	1700118,667	2,821104038	1,496259871
C01157	4-Hydroxy-Proline	588047,3333	0,975780538	-0,035371386
C00147	Adenine	56049,33333	0,093005861	-3,426534554
C00212	Adenosine	712955,6667	1,183048072	0,242508697
C00041	Alanine	611035,6667	1,013926393	0,019952922
C00020	AMP	259484	0,430576627	-1,215658089
C00062	Arginine	38536724,67	63,946189	5,998786476
C00049	Aspartate	7624	0,012650939	-6,304611743
C00327	Citrulline	68635	0,113889977	-3,134287309
C00055	CMP	16168,66667	0,026829592	-5,220031054
C00300	Creatine	33513,66667	0,055611142	-4,168482229
C00791	Creatinine	69663,66667	0,115596902	-3,112825358
C00475	Cytidine	7280	0,01208012	-6,371221412
C00016	FAD	7928,666667	0,01315649	-6,248081588
C00025	Glutamate	814283	1,351186305	0,434226611
C00064	Glutamine	9369114	15,54670615	3,958537047
C00037	Glycine	102326	0,169795378	-2,558130906
C00144	GMP	7648,333333	0,012691316	-6,300014461
C00387	Guanosine	2799,333333	0,004645094	-7,750076574
C00123	Leucine	262529,6667	0,435630475	-1,198823211
C00047	Lysine	492487,6667	0,817212923	-0,291216076
C00073	Methionine	174269,3333	0,289175061	-1,789984955
C01602	Ornithine	684024	1,135040104	0,182743273
C00292	Phenylamine	596480	0,989773343	-0,014829907
C00148	Proline	2196474	3,644734801	1,865813845
C00065	Serine	18607	0,030875658	-5,017386298
C00188	Threonine	93349	0,154899329	-2,690597199
C00078	Tryptophan	72927,66667	0,121013044	-3,046765531
C00082	Tyrosine	67661	0,112273763	-3,154907267
C00183	Valine	184480	0,306118204	-1,707839254
ID	Метаболиты ЕТВФ клеток (режим отрицательных ионов)	Площадь пика на хром.кривой (Pa)	Коэффициент (K) от максимума Pa	Логарифм K
C00062	Arginine	2807999,667	5,806109352	2,537571744
C00337	Dydroorotate	31356,33333	0,064835585	-3,947070343
C00122	Fumarate	75920,66667	0,156981391	-2,671334549
C00257	Gluconate	2220	0,004590301	-7,767195629
C00031	Glucose	27287	0,056421412	-4,14761342
C00197	Glycerate-3-P/Glycerate-2-P	15705,66667	0,032474654	-4,944542027
C00093	Glycerol-P	320795,3333	0,663309475	-0,592245961
C00667	Hexose-6-P	17587	0,036364693	-4,781317802
C00149	Malate	65093,33333	0,134593681	-2,893317416
C00295	Orotate	33814,33333	0,069917999	-3,8381923
C00042	Succinate	2554551,667	5,282054161	2,401099095
C00188	Threonine	292393,6667	0,604583264	-0,725987053
C00078	Tryptophan	90485	0,187096107	-2,418148559
C00015	UDP	11951	0,024711119	-5,338695869
ID	Метаболиты NTBF клеток (режим положительных ионов)	Площадь пика на хром.кривой (Pa)	Коэффициент (K) от максимума Pa	Log (K)
C00334	4-Aminobutyric acid	1400752,333	2,628729822	1,394365871
C01157	4-Hydroxy-Proline	276731,3333	0,519329428	-0,945278115
C00147	Adenine	78883,33333	0,148036856	-2,755971698
C00212	Adenosine	2629016	4,933757808	2,302686897
C00041	Alanine	420620,3333	0,789359537	-0,341245526
C00020	AMP	6146	0,011533926	-6,437972543
C00062	Arginine	23945221,33	44,93693561	5,489829841
C00049	Aspartate	924,3333333	0,001734655	-9,171135194
C00327	Citrulline	106373	0,199625495	-2,324632113
C00055	CMP	7412,666667	0,013911023	-6,167627672

C00300	Creatine	64041,66667	0,120184157	-3,056681361
C00791	Creatinine	56034	0,105156524	-3,249389731
C00016	FAD	10448	0,019607299	-5,672465413
C00025	Glutamate	383484	0,719667427	-0,474597734
C00064	Glutamine	15006718,67	28,16244382	4,815700625
C00037	Glycine	79549,33333	0,149286708	-2,743842375
C00144	GMP	3070,666667	0,005762584	-7,439068399
C00387	Guanosine	1141,333333	0,00214189	-8,866900109
C00123	Leucine	440853,6667	0,827330537	-0,273464261
C00047	Lysine	769445	1,443983329	0,530054086
C00073	Methionine	214444,6667	0,402438802	-1,313158684
C01602	Ornithine	755735	1,41825438	0,504116319
C00292	Phenylamine	649019	1,217985192	0,284496594
C00148	Proline	2776558	5,21064334	2,381461508
C00065	Serine	73411,33333	0,137767796	-2,859689409
C00188	Threonine	147091,3333	0,276039786	-1,857051875
C00078	Tryptophan	92496,33333	0,173583769	-2,526296038
C00082	Tyrosine	57683	0,10825113	-3,207546016
C00183	Valine	488536	0,916813859	-0,125299242
<b>ID</b>	<b>Метаболиты NTBF клеток (режим отрицательных ионов)</b>	<b>Площадь пика на хром.кривой (Pa)</b>	<b>Коэффициент (K) от максимума Pa</b>	<b>Логарифм K</b>
C00062	Arginine	2101484	37,95350631	5,246161269
C00337	Dyhydrootate	30765,33333	0,555632245	-0,847797769
C00122	Fumarate	101222,3333	1,828109311	0,870352338
C00031	Glucose	41317,66667	0,746210927	-0,42234461
C00197	Glycerate-3-P/Glycerate-2-P	7648	0,138125447	-2,855948964
C00093	Glycerol-P	115848,3333	2,09225978	1,065061991
C00149	Malate	37726,33333	0,681350241	-0,553531503
C00295	Orotate	25173	0,454632828	-1,137226232
C00042	Succinate	1391457	25,1301804	4,651349123
C00188	Threonine	286110,6667	5,167254661	2,369397987
C00078	Tryptophan	98384,33333	1,776854079	0,829325207
C00015	UDP	21253,33333	0,383842333	-1,381414264
C00667	Hexose-6-P	13333,66667	0,240810495	-2,054029827
<b>ID</b>	<b>Метаболиты ETBF везикул (режим положительных ионов)</b>	<b>Площадь пика на хром.кривой (Pa)</b>	<b>Коэффициент (K) от максимума Pa</b>	<b>Log (K)</b>
C00334	4-Aminobutiric acid	670119,0564	1,385607188	0,470518319
C01157	4-Hydroxy-L-Proline	232075,2293	0,479862649	-1,059306572
C00147	Adenine	826646,7547	1,70925998	0,773371849
C00212	Adenosine	167837,4578	0,347038016	-1,526834385
C00041	Alanine	428218,4076	0,885428489	-0,175552302
C00020	AMP	19204,6476	0,039709508	-4,654371719
C00062	Arginine	23572949,76	48,74185909	5,607089374
C00049	Aspartate	15522,48377	0,032095886	-4,961467787
C00327	Citrulline	135268,264	0,279694596	-1,838075714
C00055	CMP	1888,293307	0,00390443	-8,00067243
C00300	Creatine	146902,0033	0,303749714	-1,719045045
C00791	Creatinine	1821280,738	3,765867657	1,912982301
C00475	Cytidine	176107,3843	0,364137768	-1,457443712
C00016	FAD	877842,1077	1,815116765	0,860062359
C00025	Glutamate	408739,696	0,845152298	-0,242716753
C00064	Glutamine	4930750,298	10,19532721	3,349836174
C00037	Glycine	46019,97401	0,095155639	-3,393567041
C00144	GMP	3682,242311	0,007613783	-7,037170738
C00387	Guanosine	147702,7788	0,30540548	-1,711202147
C00135	leucine	534066,2045	1,104290297	0,143119479
C00123	Lysine	926209,7887	1,915126764	0,937439889
C00047	Methionine	303273,6547	0,627079848	-0,673278938
C00644	Ornithine	3983617,035	8,23693692	3,04210794
C00253	Phenylalanine	980413,53	2,027204003	1,019491279
C00077	Proline	4754205,915	9,830285863	3,29723337

C00148	Serine	60214,38096	0,124505457	-3,005719124
C00188	threonine	190706,2798	0,394323948	-1,342546764
C00078	Tryptophane	212236,1129	0,438841249	-1,188228957
C00082	Tyrosine	114766,7695	0,237303594	-2,075194142
C00183	Valine	877842,1077	1,815116765	0,860062359
<b>ID</b>	<b>Метаболиты ЕТBF везикул (режим отрицательных ионов)</b>	<b>Площадь пика на хром.кривой (Pa)</b>	<b>Коэффициент (К) от максимума Pa</b>	<b>Log (К)</b>
C00062	arginine	79069,14286	10,90206726	3,446529821
C00337	Dyhydrootate	13168,28571	1,815645539	0,860482579
C00122	Fumarate	9194,857143	1,267788512	0,342314101
C00257	Gluconate	9776,285714	1,347955985	0,430773389
C00031	Glucose	103865,7143	14,32102287	3,840062634
C00197	Glycerate-2-P	3995	0,550831299	-0,860317556
C00093	Glycerol-P	1029,857143	0,141996883	-2,816068832
C00667	Hexose-6-P	384,8571429	0,05306417	-4,236118131
C00149	Malate	433308,1429	59,74460258	5,900736479
C00295	Orotate	4648,428571	0,640926145	-0,641769972
C00042	Succinate	38944,57143	5,369684325	2,424837277
C00188	Threonine	15233,14286	2,100348404	1,07062866
C00078	Tryptophane	3307,714286	0,456068225	-1,132678437
C00015	UDP	1717,428571	0,236799352	-2,078262962
<b>ID</b>	<b>Метаболиты NTBF везикул (режим положительных ионов)</b>	<b>Площадь пика на хром.кривой (Pa)</b>	<b>Коэффициент (К) от максимума Pa</b>	<b>Log (К)</b>
C00334	4-Aminobutiric acid	403709,6583	0,490093729	-1,028870409
C01157	4-Hydroxy-L-Proline	436759,0068	0,530214836	-0,915351057
C00147	Adenine	1507322,945	1,829853478	0,871728132
C00212	Adenosine	1129878,912	1,371645582	0,455907753
C00041	Alanine	770658,2345	0,935560396	-0,096097304
C00020	AMP	31395,19119	0,038113	-4,713573008
C00062	Arginine	41801375,53	50,74585553	5,665218096
C00049	Aspartate	21055,90662	0,02556136	-5,28989161
C00327	Citrulline	323040,6138	0,392163466	-1,350472954
C00055	СMP	3142,378416	0,003814771	-8,034187775
C00300	Creatine	204908,2389	0,24875363	-2,007210518
C00791	Creatinine	3025077,927	3,672371195	1,876711891
C00016	FAD	1479786,038	1,796424341	0,845128176
C00025	Glutamate	813016,7278	0,986982579	-0,018903475
C00064	Glutamine	8702454,274	10,56456831	3,401161912
C00037	Glycine	104478,5862	0,126834468	-2,978981231
C00144	GMP	13136,10088	0,015946908	-5,970579495
C00387	Guanosine	346150,5378	0,420218353	-1,250788922
C00123	leucine	839244,3832	1,018822316	0,026902465
C00047	Lysine	1439508,568	1,74752847	0,80531596
C00073	Methionine	453787,1192	0,550886551	-0,860172853
C00077	Ornithine	5338355,376	6,480633884	2,696134933
C00079	Phenylanine	1476095,928	1,791944637	0,841526065
C00148	Proline	7668330,095	9,309166653	3,218652025
C00065	Serine	86263,75952	0,104722111	-3,255362014
C00188	threonine	339675,7045	0,412358063	-1,278030479
C00078	Tryptophane	308709,4417	0,374765771	-1,415938904
C00082	Tyrosine	153834,7682	0,186751676	-2,420806908
C00183	Valine	1479786,038	1,796424341	0,845128176
<b>ID</b>	<b>Метаболиты NTBF везикул (режим отрицательных ионов)</b>	<b>Площадь пика на хром.кривой (Pa)</b>	<b>Коэффициент (К) от максимума Pa</b>	<b>Log (К)</b>
C00062	arginine	126556,7143	10,39433731	3,377725878
C00337	Dyhydrootate	16184,71429	1,329280557	0,410645631
C00122	Fumarate	21838,14286	1,793607115	0,842863906
C00031	Glucose	144656	11,88086517	3,570567992
C00197	Glycerate-2-P	10575,85714	0,868614733	-0,203211672
C00093	Glycerol-P	5859,714286	0,481269186	-1,05508404
C00149	Malate	709005,8571	58,23196405	5,863739374
C00295	Orotate	7700	0,63241526	-0,661055916

C00042	Succinate	107771	8,85143181	3,145910845
C00188	Threonine	34309,14286	2,81787344	1,494606817
C00078	Tryptophane	6727,285714	0,552524434	-0,85588983
C00015	UDP	6645,857143	0,545836555	-0,87345908
C00667	D-Hexose-6-P	866	0,071126184	-3,813475432