

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

на правах рукописи

ХАРЛАМПИЕВА ДАРЬЯ ДМИТРИЕВНА

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФРАГИЛИЗИНОВ *BACTEROIDES*
FRAGILIS И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Специальность 03.01.04 Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель

д.б.н., доцент Лазарев В.Н.

Москва – 2016

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Общая характеристика <i>Bacteroides fragilis</i> . Выявление энтеротоксигенных штаммов.....	12
1.2. Влияние ВФТ на эпителиальные клетки	16
1.3. Строение молекулы ВФТ. Механизмы созревания пробелка	19
1.4. Структурно-функциональный анализ ВФТ.....	25
1.5. Активность ВФТ по отношению к различным субстратам <i>in vitro</i>	27
1.6. ВФТ-индуцированное расщепление Е-кадгерина	31
1.7. Взаимодействие ВФТ с поверхностью клеток эпителия	37
1.8. Другие эффекты воздействия ВФТ на эпителиальные клетки.....	39
1.9. Модель патогенеза заболеваний, вызываемых ЕТВФ	42
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1. Материалы	45
2.2. Штаммы <i>E. coli</i> и <i>B. fragilis</i>	45
2.3. Плазмиды	45
2.4. Линии клеток	45
2.5. Олигодезоксирибонуклеотиды	46
2.6. Полимеразная цепная реакция.....	48
2.7. Реакция рестрикции	48
2.8. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля.....	48
2.9. Реакция лигирования	48
2.10. Культивирование клеточных культур <i>E. coli</i> и трансформация их плазмидной ДНК.....	49
2.11. Выделение плазмидной ДНК.....	49
2.12. Определение нуклеотидной последовательности генома энтеротоксигенного изолята <i>B. fragilis</i>	49

2.13. Скрининг ДНК из образцов кала на наличие последовательностей, кодирующих BFT-1 и BFT-3	50
2.14. Получение фрагментов ДНК, кодирующих prBFT 1, 2 и 3	51
2.15. Конструирование экспрессионных векторов, кодирующих BFT, слитый с полигистидиновой последовательностью.....	51
2.15.1. Клонирование ДНК-фрагмента, кодирующего каталитический домен BFT-2	51
2.15.2. Клонирование ДНК-фрагментов, кодирующих prBFT-1, 2, 3	52
2.16. Конструирование плазмид, кодирующих prBFT-1, 2, 3 без полигистидиновых последовательностей.....	53
2.17. Сайт-направленный мутагенез	53
2.18. Конструирование плазмид, кодирующих потенциальные субстраты для BFT.....	55
2.18.1. Конструирование плазмид для получения E-кадгерина в <i>E. coli</i> и культуре клеток человека Hcr1293F.....	55
2.18.2. Получение гена тиоредоксина с линкером, кодирующим предполагаемый сайт расщепления для BFT.....	56
2.19. Нарботка рекомбинантных BFT	56
2.20. Выделение и процессинг рекомбинантных BFT, слитых с последовательностью из шести остатков гистидина.....	58
2.21. Выделение и процессинг рекомбинантных BFT, без последовательности из шести остатков гистидина	59
2.22. Определение N-концевой последовательности BFT-2.....	60
2.23. Гель-фильтрация	61
2.24. Получение рекомбинантного E-кадгерина в <i>E. coli</i>	61
2.25. Получение рекомбинантного E-кадгерина в Hcr1 293F.....	62
2.26. Получение фракций, обогащенных E-кадгерином, из клеток линии HT-29	62
2.27. Получение тиоредоксина с предполагаемым сайтом расщепления для BFT.....	64
2.28. Масс-спектрометрический анализ рекомбинантных белков.....	64
2.29. Определение концентрации белка.....	65

2.30. Получение поликлональных антител к рекомбинантным mBFT2-His и prBFT2-His	65
2.31. Тест активности BFT на клетках HT-29	66
2.32. Вестерн-блот гибридизация	67
2.33. Анализ жизнеспособности клеток HT-29 и индукции апоптоза после обработки mBFT-2 и prBFT-2	68
2.34. Определение протеолитической активности BFT <i>in vitro</i>	69
2.35. Исследование способности рекомбинантных prBFT к автопротеолизу	70
2.36. Сбор культуральной среды после обработки клеток линии HT-29 белком mBFT-2	70
2.37. Пробоподготовка для проведения LC-MS анализа	71
2.38. LC-MS анализ	72
2.39. Анализ изменения количества белка в культуральной среде после обработки клеток линии HT-29 белком mBFT2-His	74
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	75
3.1. Конструирование плазмид для регулируемой экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих prBFT 1, 2, 3 и каталитический домен BFT-2	75
3.2. Получение векторов для экспрессии гена, кодирующего E-кадгерин, в <i>E. coli</i> и клетках линии Expi293F	79
3.3. Получение рекомбинантных BFT	80
3.4. Получение зрелых BFT из рекомбинантных пробелков	85
3.5. Выделение рекомбинантных E-кадгеринов	88
3.6. Гель-фильтрация препаратов BFT	89
3.7. Определение нуклеотидной последовательности генома энтеротоксигенного изолята <i>B. fragilis</i>	91
3.8. Получение антител к BFT-2	92
3.9. Действие выделенных BFT на линию клеток HT-29	94
3.10. Тестирование протеолитической активности рекомбинантных BFT с использованием желатина, азоколлы, азоказеина и модифицированного тиоредоксина	98

3.11. Исследование способности рекомбинантных prVFT к автопротеолизу	100
3.12. Исследование E-кадгерина в качестве потенциального субстрата для VFT.....	100
3.13. Влияние структуры цинк-связывающего мотива на активность VFT..	101
3.14. Выявление белков, высвобождающихся в культуральную среду после обработки клеток HT-29 mVFT2-His.....	103
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	120
ВЫВОДЫ.....	122
Список сокращений	123
Список литературы	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Микрофлора кишечника человека начинает формироваться при рождении. Бактерии играют важную роль в процессах синтеза необходимых для человека веществ, участвуют в пищеварении и формировании иммунитета. Большинство микроорганизмов, населяющих кишечник, являются анаэробами, при этом около 25% видов из них принадлежат к роду *Bacteroides* (Salyers, 1984). Представители этого рода – грам-отрицательные неспорообразующие палочки. Один из них – *Bacteroides fragilis* – присутствует в нормальной флоре кишечника и участвует в процессах сбраживания углеводов и биотрансформации желчных кислот (Wexler, 2007). Однако, попадая из естественной среды обитания – кишечника – в другие органы и ткани, *B. fragilis* приводит к развитию патологий. В 1984 г. *B. fragilis* привлек внимание исследователей в связи с тем, что была выявлена его ассоциация с развитием острой диареи у новорожденных ягнят (Myers *et al.*, 1984). В своем исследовании Myers L. L. с коллегами показали, что некоторые изоляты *B. fragilis* вызывают накопление жидкости в перевязанных петлях кишечника овец и телят. Штаммы *B. fragilis*, вызывающие такое накопление, получили название энтеротоксигенных (ЕТВФ), а штаммы, не имеющие такого свойства – неэнтеротоксигенных (НТВФ). В дальнейшем было показано, что ЕТВФ, в отличие от НТВФ, секретируют белок, который получил название фрагилизин или ВФТ (*Bacteroides fragilis* toxin).

ВФТ – это секретируемый белок, кодируемый геном, входящим в состав островка патогенности в геноме *B. fragilis* (Moncrief *et al.*, 1998). ВФТ синтезируется в виде препробелка. В процессе созревания от него отщепляются сигнальный пептид и N-концевой домен. С-концевой домен (каталитический домен) является зрелой формой ВФТ (Franco *et al.*, 1997). Каталитический домен содержит мотив HEXXHXXGXXH, характерный для металлопротеиназ клана метцинкина (Bode *et al.*, 1993, Moncrief *et al.*, 1995).

Были обнаружены три изоформы BFT (BFT-1, BFT-2 и BFT-3) с различиями в аминокислотной последовательности от двух до пяти аминокислотных остатков в продомене и до двадцати пяти в каталитическом домене (Chung *et al.*, 1999, Franco *et al.*, 1997, Kato *et al.*, 2000, Kling *et al.*, 1997).

Было показано, что BFT вызывает накопление жидкости в перевязанных петлях кишечника, а также повреждения кишечника, нейтрофильное воспаление и, в ряде случаев, некроз и геморрагию (Obiso *et al.*, 1995). Главной причиной этого считается BFT-индуцируемое разрушение E-кадгерина – белка, обеспечивающего межклеточную адгезию. Утрата E-кадгерина приводит к разрушению плотных контактов между колоноцитами и, как следствие, к нарушению барьерной функции, и может способствовать выходу жидкости в просвет кишечника (Wu *et al.*, 1998). Кроме того, повышение проницаемости эпителия может способствовать развитию воспаления слизистой (Riegler *et al.*, 1999). В дополнение к вышесказанному, фрагменты, образующиеся при расщеплении E-кадгерина, обладают онкогенными свойствами (David and Rajasekaran, 2012). Показано, что расщепление E-кадгерина под действием второй изоформы BFT способствует высвобождению β -катенина. Перемещение β -катенина в ядро, в свою очередь, приводит к синтезу протоонкогена C-тус и затем к усилению пролиферации клеток (Wu *et al.*, 2003). Таким образом, имеются данные, свидетельствующие о роли BFT-индуцированного расщепления E-кадгерина в развитии воспаления слизистой кишечника и колоректального рака. До настоящего времени не было опубликовано работ, в которых все три изоформы BFT были бы одновременно выделены из одинакового источника одним и тем же способом и охарактеризована их активность на одних и тех же субстратах. Считается, что фрагилизин непосредственно расщепляет E-кадгерин, действуя как металлопротеиназа, однако это не было строго показано экспериментальным путем. Поэтому детальное изучение механизма действия BFT, в том числе выявление природного субстрата для BFT, представляется актуальной задачей.

Цель работы: изучение биологической активности рекомбинантных BFT трех изоформ.

Задачи:

- получить активные рекомбинантные BFT;
- показать биологическую активность рекомбинантных белков на линии клеток аденокарциномы толстого кишечника человека (линия HT-29);
- исследовать активность рекомбинантных BFT по отношению к E-кадгерину;
- выявить потенциальные природные субстраты для BFT путем идентификации белков, высвобождающихся с поверхности клеток линии HT-29 после обработки рекомбинантным зрелым BFT-2.

Научная новизна

В настоящее время считается, что E-кадгерин является субстратом для BFT. Это оправданно ввиду того, что BFT содержит мотив, характерный для металлопротеиназ, и, следовательно, может обладать протеолитической активностью, а E-кадгерин расщепляется при обработке BFT эпителиальных клеток кишечника. В ряде работ показана протеолитическая активность BFT-1 и BFT-3 по отношению к различным субстратам и определена предпочтительная аминокислотная последовательность в сайте расщепления для BFT-3 (Aberle *et al.*, 1996, Goulas *et al.*, 2011, Moncrief *et al.*, 1995, Shiryaev *et al.*, 2013). Однако нет исследований, в которых было бы строго продемонстрировано непосредственное расщепление очищенного E-кадгерина под воздействием BFT.

В ходе работы мы впервые получили все три описанные в литературе изоформы BFT в гетерологичной системе экспрессии *E. coli* (в литературе имеются данные только про получение BFT-3 в *E. coli*). Мы показали, что зрелые рекомбинантные BFT вызывают изменение морфологии клеток линии HT-29, а также приводят к расщеплению E-кадгерина в интактных клетках этой линии. Такая же активность описана в литературе для BFT, выделенного из культуральной жидкости *B. fragilis*. Мы продемонстрировали, что, вопреки

имеющимся в литературе данным, VFT не расщепляет такие субстраты, как желатин, азоколл и азоказеин.

Нами были получены рекомбинантные E-кадгерины в бактериях *E. coli* и клетках человека линии Expi293F (линия клеток, полученных из эмбриональной почки человека, характеризующаяся высоким выходом рекомбинантных белков). Также была выделена фракция, обогащенная E-кадгеринами, из клеток линии аденокарциномы толстого кишечника человека HT-29. Мы не выявили расщепления очищенного E-кадгерина при инкубации с VFT *in vitro*, расщепление E-кадгерина происходило только при воздействии VFT на интактные клетки человека. Таким образом, по результатам наших экспериментов, VFT расщепляет E-кадгерин не напрямую, как это предполагалось ранее, а более сложным путем, пока неизвестным.

Для выявления потенциальных субстратов для VFT с помощью тандемной хромато-масс спектрометрии были проанализированы белки, высвобождающиеся в культуральную среду после обработки VFT клеток линии HT-29. Среди них был обнаружен не только E-кадгерин, но и ряд других белков, которые мы впервые идентифицировали в своей работе. Это белки, участвующие в клеточной адгезии, пролиферации клеток, а также белки с неизвестными к настоящему времени функциями.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что существующие представления о механизме действия VFT требуют пересмотра и уточнения в ходе дальнейших исследований.

Теоретическая и практическая значимость

Данные, полученные в настоящем исследовании, могут быть использованы для выяснения механизма действия VFT на клетки эпителия кишечника. Понимание молекулярных механизмов заболеваний, с которыми ассоциированы энтеротоксигенные штаммы *B. fragilis*, может способствовать разработке новых способов их лечения и профилактики.

Методология и методы исследования

В диссертации использованы общие микробиологические методы (культивирование клеток *E. coli* штаммов B834(DE3), BL21(DE3) gold и Top10) и их трансформация, получение штаммов-продуцентов рекомбинантных белков), генно-инженерные методы (выделение плазмидной ДНК, методы рестрикционного анализа, отбор рекомбинантных клонов и другие методы молекулярного клонирования, сайт-направленный мутагенез), методы работы с линиями клеток млекопитающих (культивирование, трансфекция), методы работы с белками (получение и очистка рекомбинантных белков, Вестерн-блот гибридизация), методы протеомного анализа и биоинформатические методы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

- 1) Разработан способ получения и выделения активных рекомбинантных ВФТ трех изоформ;
- 2) впервые показано, что рекомбинантные зрелые изоформы ВФТ не расщепляют рекомбинантный полноразмерный Е-кадгерин, выделенный из *E.coli* и клеток Expi293F;
- 3) впервые идентифицированы белки, высвобождающиеся с поверхности клеток HT-29 после обработки рекомбинантным зрелым ВФТ-2.

Степень достоверности и апробация результатов

Для решения поставленных задач в работе использовались современные инструментальные методы. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных медицинской и биологической наук. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на расширенном межлабораторном заседании Отдела молекулярной биологии и генетики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (01 декабря 2015 г.), на совместном семинаре лабораторий Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный

исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (21 декабря 2015 г.), а также в ходе ряда конференций: XIX Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2012 г.), III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012 г.), 16-й конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2012 г.), Конференции Федерации Европейских Биохимических Сообществ (FEBS) совместно с Европейской Организацией по Молекулярной Биологии (EMBO) 2014 (Франция, Париж, 2014 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано три работы в рецензируемых научных журналах и пять работ в сборниках тезисов конференций.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика *Bacteroides fragilis*. Выявление энтеротоксигенных штаммов

Bacteroides fragilis – это грамотрицательная анаэробная палочковидная бактерия, присутствующая в нормальной микрофлоре кишечника человека. *B. fragilis* участвует в процессах сбраживания углеводов, утилизации белков, метаболизме желчных кислот (Wexler, 2007). Однако при выходе этой бактерии за пределы кишечника, например, в результате нарушения его целостности при патологиях или же хирургическом вмешательстве, развиваются множественные абсцессы в брюшной полости, мозге, печени, легких, почках. В изолятах, выделенных из образцов, полученных от людей с анаэробными инфекциями, причиной которых являются представители рода *Bacteroides*, *B. fragilis* преобладает (рисунок 1).

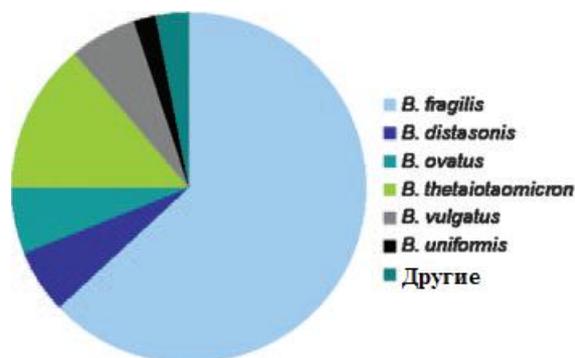


Рисунок 1. Представленность различных видов рода *Bacteroides* в образцах, полученных от людей с анаэробными инфекциями (по данным Wadsworth Anaerobe Laboratory, США) (Wexler, 2007).

В 1984 впервые была продемонстрирована ассоциация *B. fragilis* с развитием диареи у ягнят (Myers *et al.*, 1984). Эти же исследователи показали, что как сами бактерии, так и культуральная жидкость вызывали выделение воды в просвет перевязанных петель кишечника ягнят (Myers *et al.*, 1984, Myers *et al.*, 1985). В некоторых случаях выделение воды было настолько интенсивным, что приводило к разрыву петель, т.е. эффект был

сравним с воздействием холерного токсина. Штаммы *B. fragilis*, вызывающие выделение воды клетками кишечного эпителия, получили название энтеротоксигенных (ETBF), а штаммы, не обладающие такой способностью – неэнтеротоксигенных (NTBF). В 1987 г. энтеротоксигенные штаммы *B. fragilis* были изолированы из образцов кала больных диареей людей (Myers *et al.*, 1987). Было предположено, что эффект обводнения перевязанных петель кишечника вызывает белковый токсин, секретируемый в культуральную жидкость. В 1992 г. Van Tassel R.L. с коллегами выделили из культуральной жидкости *B. fragilis* штамма VPI 13784 белок с массой 19 кДа (согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, SDS-PAGE). Этот белок обладал таким же эффектом по отношению к перевязанным петлям кишечника, что и культуральная жидкость энтеротоксигенных штаммов. 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 (Van Tassell *et al.*, 1992). Основываясь на данной последовательности, были подобраны вырожденные праймеры. С использованием метода ПЦР с одним специфичным праймером (Single specific primer-PCR, SSP-PCR) был получен фрагмент гена, кодирующего BFT, и определена его нуклеотидная последовательность. Выявлено, что аминокислотная последовательность, кодируемая этим фрагментом, содержит цинк-связывающий мотив HEXXHXXGXXH, характерный для металлопротеиназ клана метцинкина (Bode *et al.*, 1993, Moncrief *et al.*, 1995). Позже была определена полная последовательность, кодирующая BFT. Franco A.A. с соавторами (Franco *et al.*, 1997) при помощи Саузерн-блот гибридизации проанализировали космидную библиотеку геномной ДНК штамма 86-5443-2-2 *B. fragilis* и выявили клоны, содержащие последовательность, кодирующую фрагмент BFT. Далее были определены нуклеотидные последовательности участков ДНК *B. fragilis* в космидах из этих клонов. Была выявлена открытая рамка считывания длиной 1191 п.н.,

кодирующая препробелок из 397 аминокислотных остатков, включающий в себя сигнальный пептид, продомен и каталитический домен. Также была определена полная последовательность, кодирующая BFT в штамме VPI 13784. Оба препробелка имели одинаковую длину, однако имели различия в аминокислотной последовательности. Так были обнаружены две изоформы BFT, получившие название BFT-1 (штамм VPI 13784) и BFT-2 (штамм 86-5443-2-2), согласно порядку их обнаружения. В дальнейшем была обнаружена еще одна изоформа – BFT-3 (Chung *et al.*, 1999, Kato *et al.*, 2000). Сравнение аминокислотной последовательности изоформ BFT приведено на рисунке 2.

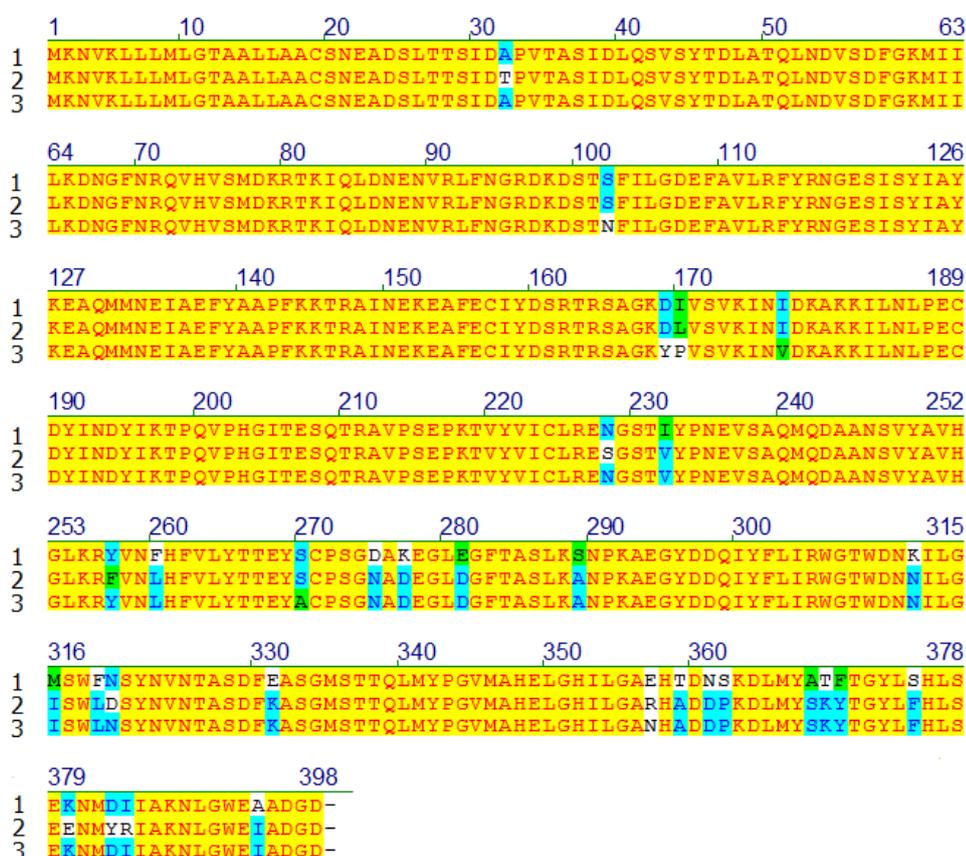


Рисунок 2. Сравнение первичной структуры BFT трех известных изоформ (GenBank ВАА 77276.1, ВАА 77277.1, ВАА 77275.1). На рисунке представлены аминокислотные последовательности препробелков, цифры 1, 2, 3 соответствуют изоформе. Желтым показаны идентичные последовательности, синим – аминокислотные остатки, одинаковые в двух изоформах, но отличные от третьей. Зеленым отмечены аминокислотные остатки, по свойствам подобные аминокислотным остаткам в том же положении в других изоформах.

Бактерии энтеротоксигенных штаммов могут обладать двумя копиями гена *bft*, при этом эти гены кодируют одну и ту же изоформу BFT (Scotto d'Abusco *et al.*, 2000). Ген *bft* вместе с геном другой металлопротеиназы – *mpII* – входит в состав островка патогенности длиной примерно 6 т.п.о. (BfPAI). Островок патогенности находится внутри конъюгативного транспозона 86 CTn (Franco, 2004, Franco *et al.*, 1999, Moncrief *et al.*, 1998). Основываясь на наличии островка патогенности и конъюгативного транспозона 86 CTn или родственного ему 9343 CTn, штаммы *B. fragilis* могут быть разделены на три группы (рисунок 3):

I – содержат конъюгативный транспозон 86 CTn и островок патогенности, все эти штаммы энтеротоксигенные;

II – не содержат островок патогенности и конъюгативные транспозоны 86 CTn, 9343 CTn или родственные им, не энтеротоксигенные;

III – содержат транспозон 9343 CTn, но лишены самого островка патогенности, не энтеротоксигенные.

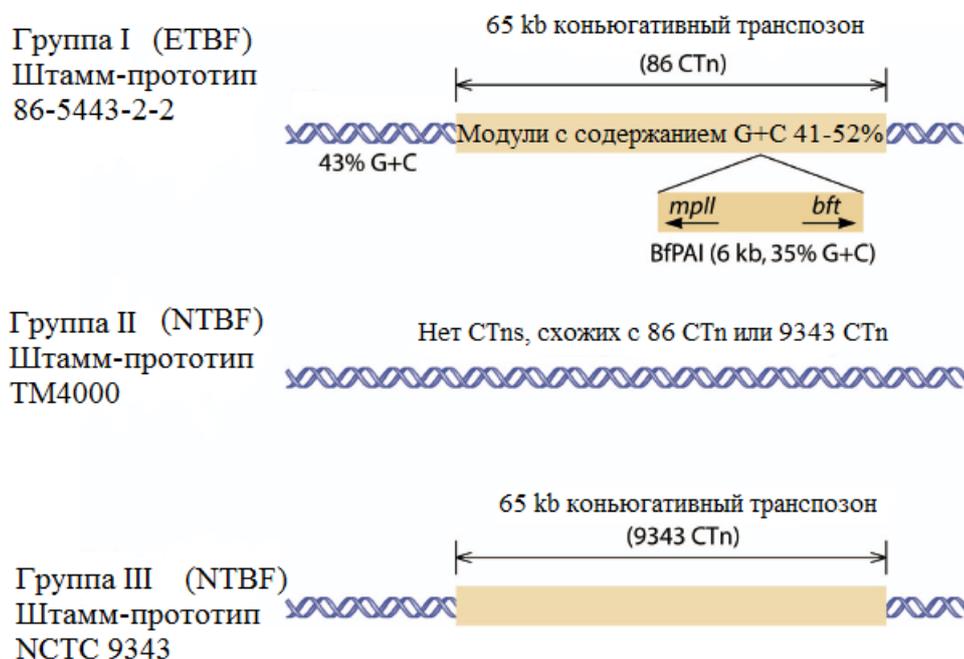


Рисунок 3. Схематическое изображение участка генома *B. fragilis*, определяющего его принадлежность к группам I, II или III (Sears, 2009).

Биологическая активность продукта гена *mpII* не установлена. Известно только, что мутации в этом гене не влияют на процессинг и секрецию зрелого VFT-2. Группа авторов (Shiryayev *et al.*, 2013) исследовала рекомбинантную металлопротеиназу МРП, выявила предпочитаемый сайт для расщепления, и показала, что МРП способна связываться с белком клеточной мембраны, E-кадгерином. Авторы предполагают, что МРП и VFT действуют совместно, приводя к ослаблению межклеточных контактов (Remacle *et al.*, 2014). Тем не менее, следует отметить, что, по данным других исследователей (Sears, 2009), в культуральной среде *B. fragilis* не удавалось одновременно детектировать присутствие VFT и МРП.

1.2. Влияние VFT на эпителиальные клетки

Для выявления штаммов *B. fragilis*, продуцирующих VFT, изначально использовали животные модели. Показано, что детеныши кроликов легко инфицируются энтеротоксигенными штаммами *B. fragilis* (Myers *et al.*, 1990, Myers *et al.*, 1989), что часто приводит к развитию диареи с летальным исходом. Также эти штаммы вызывают накопление жидкости в просвете перевязанных петель кишечника ягнят и телят (Myers *et al.*, 1984, Myers *et al.*, 1985). Однако эти модели не пригодны для скрининга большого количества изолятов *B. fragilis* по причине трудоемкости эксперимента и его высокой стоимости. Weikel C.S. с соавторами (Weikel *et al.*, 1992) разработали метод детекции энтеротоксигенных штаммов *B. fragilis in vitro* с использованием линии клеток аденокарциномы толстого кишечника HT-29/C1, характеризующийся 89% чувствительностью и 100% специфичностью (согласно исследованию тестируемых образцов на перевязанных петлях кишечника ягнят). Субконфлюэнтные клетки HT-29/C1, обработанные концентрированной культуральной жидкостью энтеротоксигенных штаммов *B. fragilis*, демонстрировали специфические изменения морфологии: потерю контакта между клетками, округление и набухание клеток (рисунок 4).

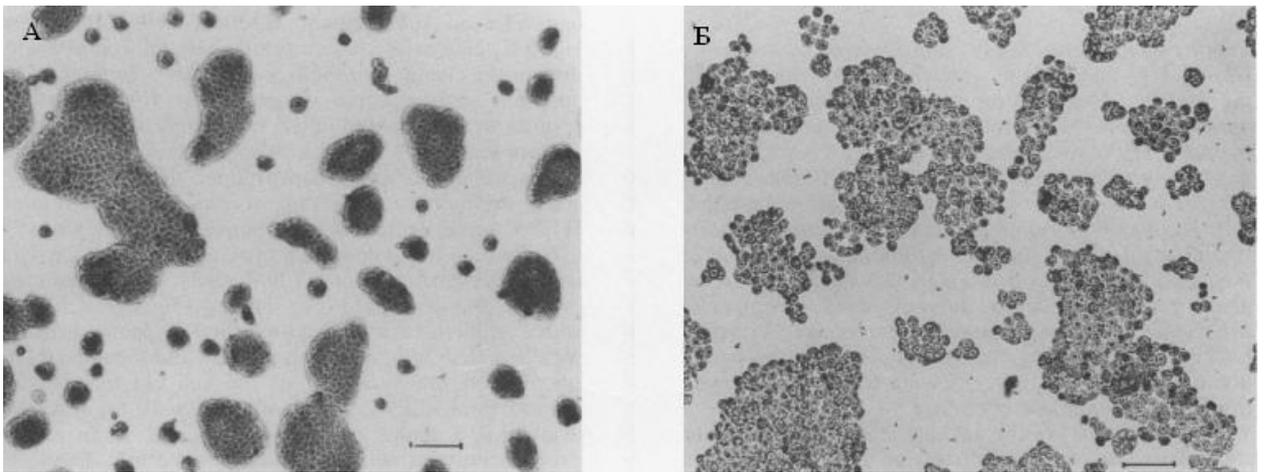


Рисунок 4. Изменение морфологии клеток HT-29/C1 после обработки BFT. А – клетки линии HT-29/C1, обработанные в течение 3 ч фильтратом культуральной жидкости неэнтеротоксигенного штамма 077225-2, Б - клетки линии HT-29/C1, обработанные в течение 3 ч фильтратом культуральной жидкости энтеротоксигенного штамма 86-5443-2-2 (BFT-2) (Weikel *et al.*, 1992).

Эти морфологические изменения становились видимыми в течение часа после обработки и прогрессировали в течение 24 ч. Этот метод стал в дальнейшем использоваться для выявления энтеротоксигенных штаммов *B. fragilis* и тестирования активности выделенных препаратов BFT.

К настоящему времени активность BFT *in vitro* исследована с использованием перевиваемых линий эпителиальных клеток, способных формировать поляризованный монослой. В основном изучены линии клеток эпителия кишечника человека HT29, HT29/C1, Caco-2, T84, SW480, и HCT116 (Obiso *et al.*, 1997, Weikel *et al.*, 1992, Wu *et al.*, 2003, Wu *et al.*, 2006), которые меняют морфологию после инкубации с BFT. В одном исследовании показано также, что линии эпителиальных клеток почки собаки (Madin-Darby Canine Kidney, MDCK) и аденокарциномы легких человека (Calu-3), способные к поляризации *in vitro*, также демонстрировали морфологические изменения в ответ на обработку BFT (Obiso *et al.*, 1997). В целом, лучше всего изучена клеточная линия HT29/C1, для которой характерна концентрационно-зависимая чувствительность к BFT (Mundy and Sears, 1996,

Saidi and Sears, 1996). Показано, что минимальная концентрация BFT, изменяющая морфологию клеток HT-29, составляет 0,5 pM (Saidi and Sears, 1996). Отличительными чертами биологического ответа на обработку BFT субконфлюэнтного монослоя клеток HT29/C1 являются быстрые (начинающие развиваться в течение 10-15 мин) и температуро-зависимые (максимальные при 37°C) морфологические изменения, включающие в себя округление и набухание клеток, а также утрату межклеточных контактов (Moncrief *et al.*, 1995, Mundy and Sears, 1996, Saidi and Sears, 1996, Weikel *et al.*, 1992, Wu *et al.*, 1998). Эти изменения схожи с изменениями морфологии эпителиальных клеток кишечника, колонизированного ETBF (Rabizadeh *et al.*, 2007). Показано также, что вызываемые BFT изменения морфологии клеток обратимы. Так, субконфлюэнтные HT29/C1 клетки восстанавливают свою форму (согласно данным световой микроскопии) через 2-3 дня после обработки BFT с последующей отмывкой (Saidi and Sears, 1996, Weikel *et al.*, 1992).

В дальнейшем было выявлено, что после обработки BFT эпителиальных клеток, способных к поляризации, происходит расщепление E-кадгерина (Wu *et al.*, 1998). 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 (Wu *et al.*, 1998). Таким образом, помимо изменения морфологии клеток, расщепление E-кадгерина служит еще одним признаком наличия в препарате BFT.

1.3. Структура молекулы BFT. Механизмы созревания пробелка

В клетках *B. fragilis* BFT синтезируется в виде препробелка, содержащего сигнальный пептид Sec-транслоказы и пространственно организованный в два плотно контактирующих домена. В процессе созревания сигнальный пептид и N-концевой домен отщепляются. С-концевой домен, в составе которого имеется характерный для металлопротеиназ цинк-связывающий мотив (HEXXHXXGXXH) (Moncrief *et al.*, 1995), является активной формой токсина (mBFT) (Franco *et al.*, 1997) (рисунок 5).

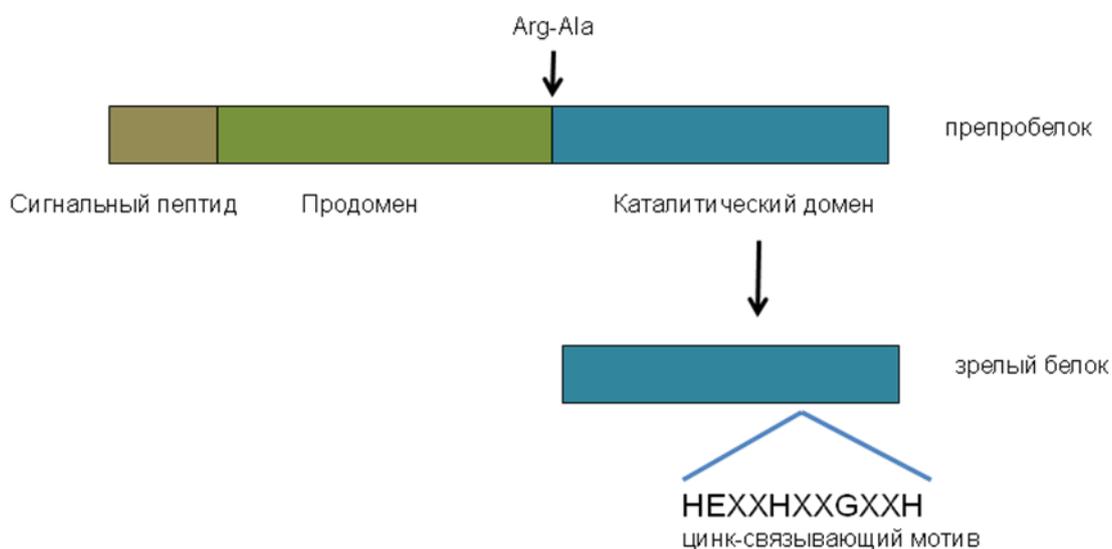


Рисунок 5. Схема строения молекулы BFT. Все изоформы BFT (BFT-1, BFT-2, BFT-3) синтезируются в виде препробелка, состоящего из сигнального пептида, продомена и каталитического домена. В процессе созревания происходит отщепление сигнального пептида и продомена. Пробелок имеет массу около 45 кДа, а зрелый белок - около 20 кДа.

Механизм, по которому происходит расщепление пробелка (prBFT) в природных условиях, неизвестен. Не установлено, происходит ли отщепление N-концевого домена в периплазме *B. fragilis*, и наружу секретруется зрелый белок, или же происходит секреция пробелка, процессинг которого осуществляется внеклеточными протеиназами (Franco *et al.*, 1997, Sears, 2009). Непонятен также механизм секреции BFT из

периплазмы наружу. Franco A. с соавторами продемонстрировали *in vivo*, что мутации в цинк-связывающем мотиве каталитического домена prBFT не приводят к нарушению процессинга пробелка, что исключает автопротеолиз в качестве единственного механизма активации предшественника (Franco *et al.*, 2005). В этой же работе представлены данные Вестерн-блот гибридизации лизатов клеток *B. fragilis* энтеротоксигенного штамма с антителами к BFT. В лизате были обнаружены как пробелок, так и зрелая форма токсина. Следовательно, процессинг пробелка может происходить внутри клетки. Установлен сайт расщепления пробелка: Arg211-Ala212 (Franco *et al.*, 1997, Moncrief *et al.*, 1995).

Goulas T. и коллеги (Goulas *et al.*, 2011) разрешили пространственную структуру prBFT-3 методом рентгеноструктурного анализа (рисунок 6). Пробелок состоит из двух доменов, плотно контактирующих друг с другом (рисунок 6 А).

Продомен представлен большим скрученным β -листом (тяжи β 4- β 8, β 10 и β 9), проходящим через весь домен. N-концевой участок, предшествующий β 4, включает в себя α -спираль α 1 и β -лист из трех тяжей (β 1, β 2 и β 3). Этот β -лист расположен ортогонально по отношению к большому β -листу, и вместе они образуют β -сэндвич (рисунок 6 А и Б). После тяжа β 8 идет спираль α 2, переходящая в 3_{10} -спираль η 1. Затем следуют последние тяжи этого листа, β 9 и β 10, сопровождаемые спиралью α 3, выходящей на поверхность домена. Заканчивается домен тяжом β 11, идущим вдоль каталитического домена (рисунок 6 А и Б).

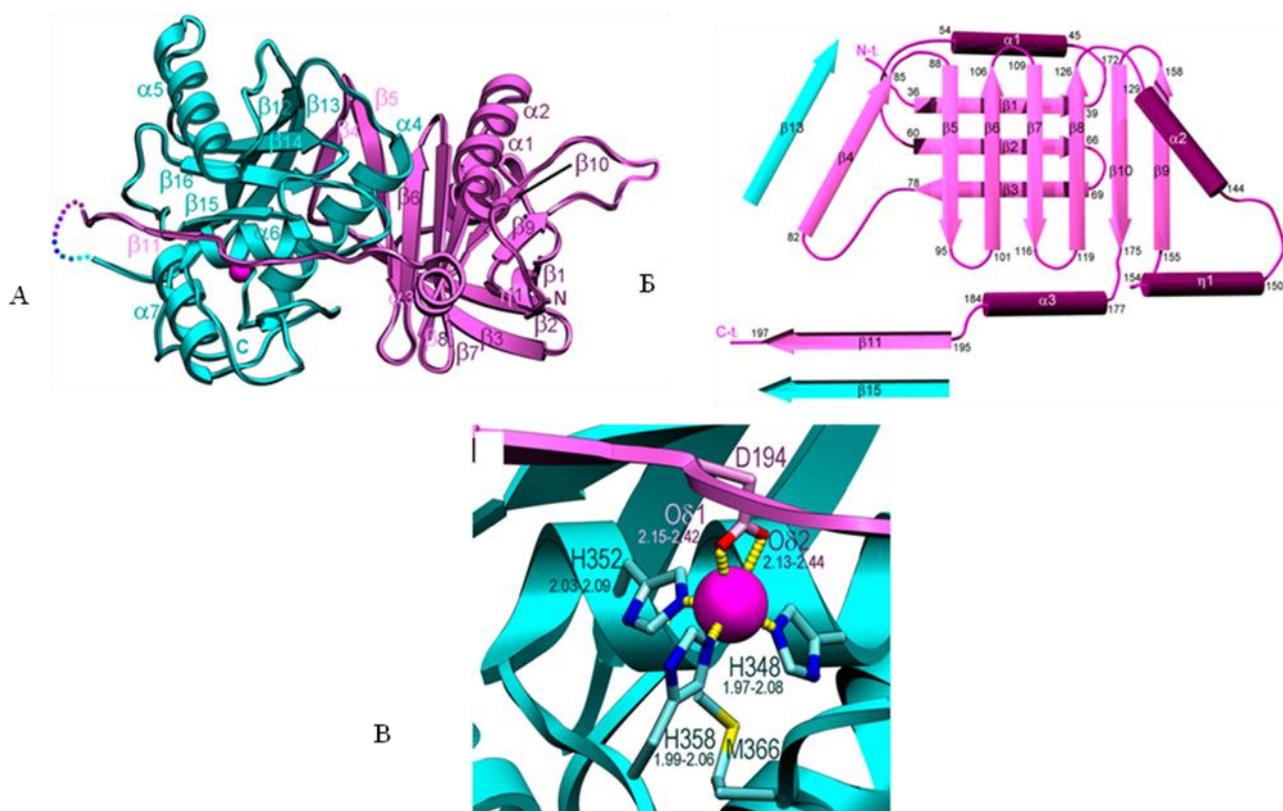


Рисунок 6. Строение молекулы prBFT-3. А. Диаграмма Ричардсона для prBFT-3. Сиреневым цветом выделен продомен, бирюзовым – каталитический домен. Б. Топология продомена. Показаны β -тяжи $\beta 1$ – $\beta 11$ и спирали $\alpha 1$ – $\alpha 3$. Тяжи $\beta 4$ и $\beta 11$ формируют параллельные β -слои с тяжами $\beta 13$ и $\beta 15$ каталитического домена, соответственно. В. Цинк-связывающий участок prBFT-3 с ионом металла (показан сиреневым цветом), который координирован остатком Asp 194 продомена и остатками His348, His352 и His358 каталитического домена (Goulas *et al.*, 2011).

Каталитический домен разделен активным центром на верхний (Thr210/Arg211-Gly355) и нижний (Ala356-Asp397) субдомены. Верхний субдомен состоит из скрученного β -листа из пяти β -тяжей, при этом $\beta 15$ образует верхнюю часть кармана активного сайта. Две спирали, $\alpha 4$ и $\alpha 5$, располагаются на вогнутой и выпуклой сторонах листа, соответственно. Верхний субдомен заканчивается «спиралью активного центра», $\alpha 6$, которая включает в себя первую часть цинк-связывающего мотива, в том числе два остатка гистидина, хелатирующих ион цинка – His348 и His352, и каталитический остаток глутаминовой кислоты Glu349. В области Gly355, также входящего в цинк-связывающий мотив, полипептидная цепь делает

резкий поворот книзу. Далее начинается нижний субдомен, который представлен всего 42 аминокислотными остатками. В этот домен входят третий остаток гистидина, хелатирующий ион цинка, метиониновый поворот (Asp364-Leu365-Met366-Tyr367) и С-концевая спираль $\alpha 7$ (рисунок 6 А). Далее С-концевой участок полипептида формирует петлю, заякоренную через остаток аспарагиновой кислоты Asp397 с боковыми цепями остатков His252 и Arg256 из петли L $\alpha 4\beta 13$ верхнего субдомена. Можно предположить, что отсутствие С-концевых аминокислот, и, следовательно, описанных выше связей, приведет к уменьшению стабильности структуры, а также активности каталитического домена. Это предположение подтверждается ранее полученными данными, демонстрирующими, что отсутствие двух С-концевых аминокислотных остатков у BFT-1 значительно снижает его активность, а при делеции восьми С-концевых остатков активность исчезает полностью (Sears *et al.*, 2006).

Продомены в проферментах блокируют доступ субстрата к активному центру. В случае prBFT-3 площадь контакта продомена с каталитическим доменом составляет 1,996 Å². Во взаимодействии доменов принимают участие 63 аминокислотных остатка. Наиболее важными для поддержания каталитического домена в неактивном состоянии являются $\alpha 3$, L $\alpha 3\beta 11$ и $\beta 11$ продомена, которые располагаются вдоль передней стороны каталитического домена справа налево. При этом тяж $\beta 11$ продомена взаимодействует с тяжом $\beta 15$, образующим верхнюю часть кармана активного сайта. Также эта часть продомена сближена с началом спирали $\alpha 5$ над карманом активного центра, а также с L $\beta 14\beta 15$, L $\beta 15\beta 16$, L $\beta 16\alpha 6$, спиралью $\alpha 6$ активного центра и сегментом, соединяющим метиониновый поворот с С-концевой спиралью $\alpha 7$.

Дополнительные участки, вовлеченные во взаимодействие доменов, включают в себя доступную для растворителя часть спирали $\alpha 4$ каталитического домена и вогнутую часть большого β -листа продомена. Во взаимодействии участвуют аминокислотные остатки тяжей $\beta 5$ - $\beta 8$ и $\beta 10$ (продомен), тяжи $\beta 13$ (каталитический домен) и $\beta 4$ (продомен), образующие

параллельный β -слой, а также спираль $\alpha 3$ и $L\alpha 3\beta 11$ (продомен), спираль $\alpha 5$, петли $L\beta 15\beta 16$, $L\alpha 6\alpha 7$, и $L\beta 16\alpha 4$ (каталитический домен).

Выступ, предшествующий $\beta 11$, образован 1,4-поворотом, включающим в себя Tyr191-Asp194. При этом боковые цепи Tyr191 и Asp194 обращены внутрь кармана к каталитическому остатку глутаминовой кислоты, в то время как боковые цепи Ile192 и Asn193 обращены наружу, к растворителю. S_1' сайт активного центра окружен аминокислотными остатками Ile313, Leu314, Gly344, Val345, His352, His358, Leu365, и Tyr370, а также пептидным остовом сегмента Leu365-Leu374 (рисунок 7 Б).

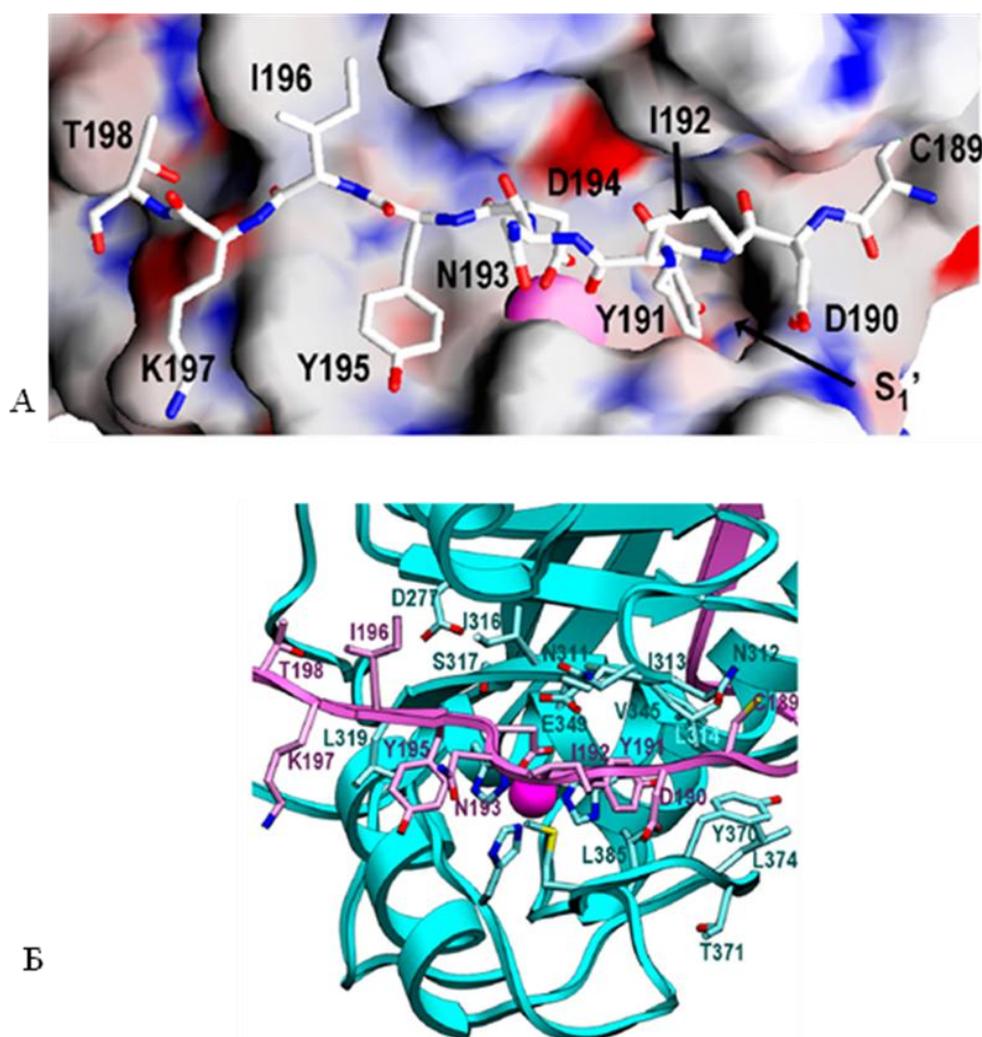


Рисунок 7. Активный центр rgBFT-3. А. Детали строения активного центра BFT-3. Показана поверхность Коннолли субстрат-связывающего участка. Фрагмент продомена Cys189-Thr198 представлен в виде стержневой модели. Б. Приближенный участок диаграммы Ричардсона с рисунка 6 А, соответствующий активному центру и его окружению (Goulas *et al.*, 2011).

Хотя боковые цепи аминокислотных остатков, окружающих S1' карман, гидрофобны, этот карман доступен и для больших гидрофильных остатков, которые могут связываться карбонильными группами пептидного остова, принадлежащими Leu365, Asp364, Tyr367 или Tyr373.

Tyr195 занимает сайт S2, окруженный His352, Leu319 и His358, а Ile196, вероятно, занимает сайт S3 (окружение Trp318, Leu280, As277 и Ile316, рисунок 7 А и Б). Как и в случае с S1, эти сайты доступны для различных типов аминокислотных остатков. Таким образом, структура активного центра согласуется с широкой субстратной специфичностью, которую BFT-3 демонстрирует *in vitro* (Goulas *et al.*, 2011).

Asp194 продомена образует координационную связь с ионом цинка взамен молекулы воды, которая принимает участие в катализе. Таким образом, ион цинка в пробелке образует комплексные связи с тремя остатками гистидина (His348, His352, His358) и остатком аспарагиновой кислоты Asp194 (рисунок 6 В), а в зрелом белке – с тремя остатка гистидина и молекулой воды, необходимой для катализа. Такой механизм ингибирования активности каталитического домена получил название «аспаратный выключатель» по аналогии с «цистеиновым выключателем» в случае с матриксными металлопротеиназами и протеиназами семейства A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM). В случае с «цистеиновым выключателем», атом Sγ остатка цистеина замещает молекулу растворителя в активном центре пробелка (Rosenblum *et al.*, 2007, Springman *et al.*, 1990). «Аспаратный выключатель» описан также для проастацина (Guevara *et al.*, 2010). Однако у проастацина по сравнению с prBFT продомен короче (34 аминокислотных остатка против 191), и его структура, а также взаимодействие с каталитическим доменом, отличаются от prBFT-3.

Не было найдено структурного сходства между продоменом prBFT-3 и структурами, имеющимися в Protein Data Bank (PDB) (Goulas *et al.*, 2011). В то же время каталитический домен демонстрирует структурное сходство с представителями семейства ADAMs, хотя сходство аминокислотных

последовательностей составляет всего 15%. Следующими по степени структурного сходства с BFT-3 являются улилизин, матриксные металлопротеиназы, сerratилизины и астацины. Все они входят в клан метцинкина класса металлоротеиназ. Goulas T. и коллеги предполагают, что BFT произошел от ксенолога adamalysin/ADAM млекопитающих, который попал в *B. fragilis* путем горизонтального переноса генов от эукариотической к бактериальной клетке (Goulas *et al.*, 2011).

Сходство аминокислотных последовательностей изоформ BFT позволяет предположить, что все они имеют сходную пространственную структуру. Различия между изоформами фрагилизина достигают 25 аминокислотных остатков в каталитическом домене (рисунок 2). При этом примерно половина из них (12 из 25) расположена в нижнем субдомене. Отличающиеся аминокислоты располагаются преимущественно на поверхности молекулы и в целом не влияют на ее третичную структуру. Только три замены в BFT-1 (Asp277Lys, Asn312Lys и Lys331Glu) могут оказывать влияние на связывание субстрата и приводить к изменению участков по обе стороны активного центра за пределами сайтов S5 и S'3. В BFT-1 по сравнению с BFT-3 нет аминокислотных замен в участках, которые могли бы оказать влияние на размер карманов S1 и S'1 и объяснить предпочтительное связывание гидрофобных аминокислотных остатков, как это было показано в работах (Moncrief *et al.*, 1995).

1.4. Структурно-функциональный анализ BFT

Для выявления структурно-функциональных связей в белке создают генно-инженерные системы, позволяющие проводить сайт-направленный мутагенез. В работе (Franco *et al.*, 2002) описана система гомологичной экспрессии *bft-2*. На основе не энтеротоксигенных *B. fragilis* (группа III), были получены штаммы *B. fragilis*, продуцирующие BFT-2 дикого типа (P-BFT), а также BFT-2 с мутациями в цинк-связывающем домене и с заменой каталитического остатка глутаминовой кислоты на остаток аланина (BFT-

H348D, BFT-E349A, BFT-H352Y, BFT-G355R, BFT-H358Y, BFT-M366R). Однако эти белки не были выделены в виде гомогенного препарата, а была исследована активность культуральной среды соответствующих штаммов *B. fragilis*, а также лизатов бактерий в отношении клеток линии HT-29 (Franco *et al.*, 2005). При этом изменение морфологии – округление – клеток линии HT-29 вызывали только культуральные жидкости и лизаты штаммов, продуцирующих BFT-2 дикого типа и BFT-G355R. Также расщепление Е-кадгерина в клетках линии HT-29 происходило только после обработки культуральными жидкостями, содержащими BFT-2 дикого типа и BFT-G355R. Таким образом, мутации в цинк-связывающем домене BFT-2 влияют на его биологическую активность (Franco *et al.*, 2005). Для BFT-3 описано получение мутантного белка BFT-3-E349A в гетерологичной системе *E. coli*. Показано, что мутантный рекомбинантный белок обладал только остаточной протеолитической активностью в отношении фибриногена и казеина по сравнению с рекомбинантным белком дикого типа (Goulas *et al.*, 2011). Продемонстрировано также, что С-концевой домен BFT-2 необходим для его активности (Sears *et al.*, 2006). Получены мутантные BFT-2 с делецией двух, четырех, семи, девяти, одиннадцати и восемнадцати С-концевых аминокислот, а также рекомбинантный белок с заменой E394A. Показано, что делеция даже двух С-концевых аминокислот значительно снижает биологическую активность BFT-2, а делеция восьми и более аминокислот приводит к утрате активности (Sears *et al.*, 2006).

Для BFT-2 предсказана возможность формирования амфипатической структуры с участием С-концевых аминокислотных остатков, что дает возможность предположить, что BFT-2 способен к олигомеризации и встраиванию в мембрану клеток с формированием поры (Sears, 2001). Тем не менее, данные, подтверждающие или опровергающие эту гипотезу, в литературе отсутствуют.

1.5. Активность BFT по отношению к различным субстратам *in vitro*

В литературе имеются сведения об активности изоформ 1 и 3 (таблица 1) по отношению к ряду субстратов. В том числе, для определения общей протеолитической активности препаратов используют желатин и хромогенные субстраты, такие как азоколл и азоказеин.

Показано, что BFT-1 обладает сильной желатиназной активностью, а также гидролизует коллаген, актин, тропомиозин и фибриноген. Зрелый BFT-3 расщепляет казеин, фибриноген, актин, азоказеин, азоколлаген, фибронектин, а также казеин, конъюгированный флуоресцеином, но не азоальбумин. Из таблицы 1 видно, что BFT-3, в отличие от BFT-1, расщепляет фибронектин и азоказеин. Однако следует отметить, что в данном случае BFT получали из различных источников – культуральной жидкости *B. fragilis* (BFT-1) и растворимой фракции бактерий штамма-продуцента *E. coli* (BFT-3).

Таблица 1.

Исследование протеолитической активности BFT-1 и BFT-3 с использованием различных субстратов (Goulas *et al.*, 2011, Moncrief *et al.*, 1995).

	казеин	фибриноген	актин	фибронектин	азоколл	азоказеин	желатин	тропомиозин	азоальбумин	BSA	ламинин	IgA человека	автолиз
BFT-1	?	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
BFT-3	+	+	+	+	+	+	?	?	-	?	?	?	+

(«+» – гидролизует белок, «-» – не гидролизует белок, «?» – не тестировали данный субстрат).

В работах (Goulas *et al.*, 2011, Moncrief *et al.*, 1995) определены сайты расщепления некоторых субстратов BFT-1 и BFT-3 (таблица 2). Расщепление

субстратов BFT-1 происходит по сайтам между незаряженной полярной аминокислотой (Cys, Ser, Gly или Thr) и гидрофобной аминокислотой (Leu или Met). В случае расщепления актина гидролиз происходит быстрее при расщеплении по сайту Gly↓Met, расположенного рядом с N-концом актина (таблица 2). Интересно, что эта же область актина расщепляется рядом других протеиназ, в том числе металлопротеиназой термолизинном (Moncrief *et al.*, 1995).

Таблица 2.

Сайты расщепления некоторых субстратов белками BFT-1 и BFT-3
(Goulas *et al.*, 2011, Moncrief *et al.*, 1995).

Субстрат для BFT-1	Сайт расщепления
BFT-1 (автопротеолиз зрелого белка)	C↓LRENG S↓LKSNPKAEG
актин	T↓LKYP G↓MGNK
Субстрат для BFT-3	Сайт расщепления
prBFT-3 (автопротеолиз рекомбинантного пробелка)	MACS↓NEAD ADSL↓TTSI SLTT↓SIDA LTTS↓IDAP ITES↓QTRA SQTR↓AVPS
α-казеин	EQKY↓IQKE
фибриноген	GKEK↓VTSG

Определены рН оптимумы работы BFT при 37 °С– 6,5 для BFT-1 (по гидролизу азоколл (время гидролиза 6 ч) и актина (время гидролиза 2ч)) (Moncrief *et al.*, 1995) и 5,5 для BFT-3 по гидролизу азоколл (Goulas *et al.*, 2011). Проведен также ингибиторный анализ активности BFT-1 и BFT-3. Было выявлено, что цинк-связывающие хелатирующие агенты 1,10-фенантролин и Zincov, а также ЭДТА, выступают активными ингибиторами протеолиза желатина и актина BFT-1, а также автолиза токсина. Добавление

цинка к BFT-1, обработанному ЭДТА, восстанавливает примерно 50% протеолитической активности в отношении актина. Протеолиз незначительно ингибируется избыточным добавлением цинка, что наблюдается и у других металлопротеиназ. Кроме того, гидролиз актина ингибируется при добавлении α -макроглобулина и диэтилпирокарбоната, которые также препятствуют протеолитической активности других металлопротеиназ. Активность BFT-3 также полностью исчезает при обработке образца стандартными цинк-хелатирующими агентами. При использовании ингибиторов сериновых, цистеиновых или аспартильных протеиназ наблюдаются лишь незначительные изменения активности BFT-3 (таблица 3).

Таблица 3.

Ингибирование протеолитической активности BFT-3 (Goulas *et al.*, 2011). В качестве субстрата использовался казеин, конъюгированный с флуоресцеином.

Ингибитор	Специфичность (класс протеиназ)	Концентрация	Относительная активность, %
Апротинин (легкие быка)	сериновые	0,3 мкМ	97
PMSF	сериновые	1 мМ	82
Бензамидин	сериновые	5 мМ	94
Refabloc	сериновые	4 мМ	88
Йодацетамид	цистеиновые	1 мМ	92
Е-64	цистеиновые	10 мкМ	94
Пепстатин А	аспартильные	10 мкМ	92
ОРА (1, 10 - фенантролин)	металлопротеиназы	5 мМ	0
ЭДТА	металлопротеиназы	5 мМ	0
ZnCl ₂	металлопротеиназы	5 мМ	18
СТ1746	матриксины (мп)	10 мкМ	13
Фосфоамидон	термолизин (мп)	10 мкМ	88
Капроприл	ангиотензин-превращающий фермент (мп)	1 мМ	101

В совокупности эти данные указывают на то, что BFT-1 и BFT-3 являются металлопротеиназами, демонстрирующими широкую субстратную специфичность *in vitro*. Однако следует отметить, что все вышеупомянутые субстраты не являются природными, и информация об их расщеплении не дает представления о механизме действия BFT.

Определение субстратной специфичности протеиназ – важный шаг для разработки антагонистов – прототипов лекарств. В работе (Shiryaev *et al.*, 2013) S.A. Shiryaev с соавторами использовали комбинаторную библиотеку пептидов и установили предпочтительные аминокислоты в сайте расщепления для BFT-3 (рисунок 8).

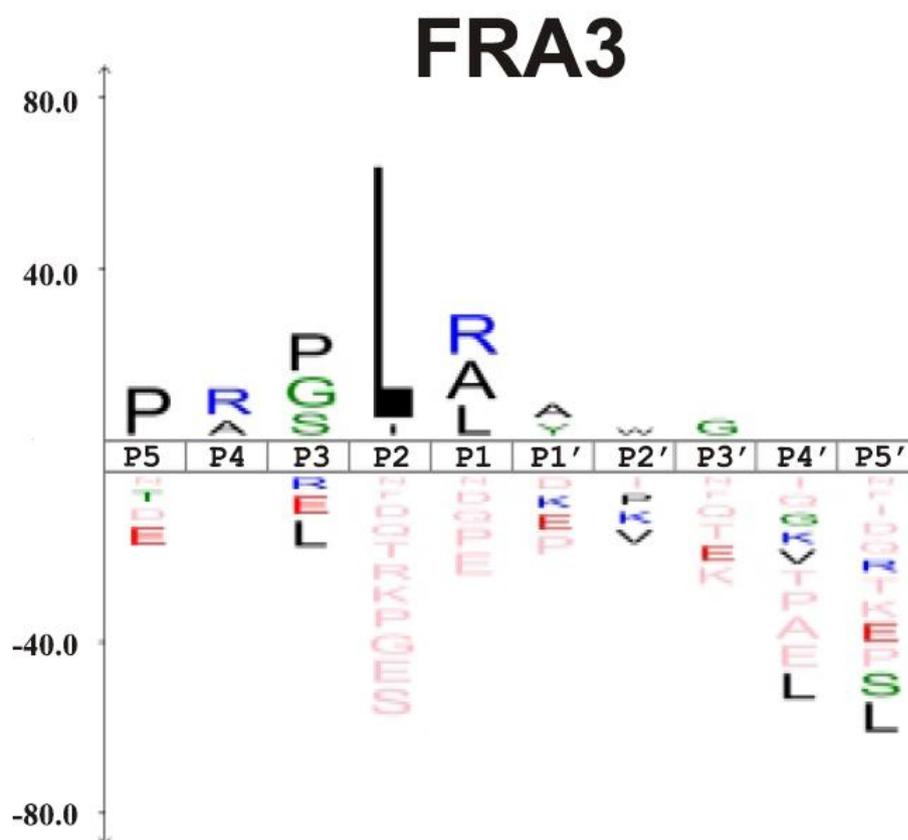


Рисунок 8. Частотная диаграмма сайтов расщепления для рекомбинантного BFT-3. Высота символа пропорциональна частоте встречаемости аминокислоты в конкретном положении расщепляемого пептида (Shiryaev *et al.*, 2013).

Авторы заключили, что предпочтительным мотивом для расщепления BFT-3 является Pro-X-X-Leu-(Arg/Ala/Leu)↓. Этот мотив сходен с

аналогичными для матриксных металлопротеиназ человека (Shiryaev *et al.*, 2013).

В отличие от изоформ 1 и 3 сведения о протеолитической активности ВФТ-2 *in vitro* отсутствуют. Кроме того, нет работ, в которых были бы исследованы свойства всех трех изоформ ВФТ, выделенных одним и тем же методом из одного и того же источника.

1.6. ВФТ-индуцированное расщепление E-кадгерина

На сегодняшний день единственным идентифицированным клеточным белком, который расщепляется после обработки эпителиальных клеток ВФТ, является белок межклеточных контактов - E-кадгерин (Wu *et al.*, 1998). Кадгеринины представляют собой семейство молекул клеточной адгезии. Кадгеринины играют ключевую роль в регуляции морфогенеза (Huber *et al.*, 1996, Takeichi, 1991), участвуют в поляризации клеток (McNeill *et al.*, 1990) и трансмембранном транспорте (Dantzig *et al.*, 1994, Thomson *et al.*, 1995), выступают в роли опухолевых супрессоров (Birchmeier and Behrens, 1994).

Члены суперсемейства кадгеринов имеют свои характерные черты. У всех них присутствуют внеклеточный N-концевой участок, представленный повторяющимися доменами (так называемые кадгериновые домены, EC) из примерно 110 аминокислотных остатков, один трансмембранный участок и C-концевой цитоплазматический участок.

Кадгеринины разделяют на подсемейства согласно структурным особенностям – в частности, по количеству кадгериновых доменов внеклеточного фрагмента, по гомологии региона CAR (cell adhesion recognition region) кадгеринового домена 1 (EC1), а также по гомологии C-концевого участка, обуславливающего взаимодействия с цитоскелетом и белками цитоплазмы (Pouliot, 1992).

Подсемейство классических кадгеринов включает в себя V-, E-, EP-, N-, P- и R-кадгеринины.

Они содержат строго консервативную последовательность в сайте CAR EC1 домена, а также четыре кадгериновых домена EC2-5 и высококонсервативный С-концевой участок (Geiger and Ayalon, 1992).

В другое подсемейство входят десмосомные кадгерины, десмоглеины и десмоколлины. Они имеют сходную с классическими кадгеринами структуру внеклеточного фрагмента, в то время как С-концевой участок имеет дополнительные повторы из 29 ± 1 аминокислотных остатков, которые не представлены в других подсемействах кадгеринов (Koch and Franke, 1994).

Еще один тип кадгеринов представлен Т-кадгерином кур и его аналогом у человека - кадгерином-13. Структура внеклеточного домена этого типа кадгеринов сходна с другими кадгеринами, но трансмембранный домен отсутствует. На поверхности мембраны этот тип кадгеринов закрепляется за счет гликозилфосфатидилинозитольного якоря (Ranscht and Dours-Zimmermann, 1991, Tanihara *et al.*, 1994).

Протокадгерины выявлены в центральной нервной системе и отличаются от классических кадгеринов наличием одного или двух дополнительных доменов во внеклеточном фрагменте и полным отсутствием гомологии внутриклеточных участков (Sano *et al.*, 1993).

Следующее подсемейство кадгеринов представлено LI- и Ksp-кадгеринами. В отличие от классических кадгеринов, внеклеточный домен членов этого подсемейства представлен семью (а не пятью) кадгериновыми доменами. Кроме того, у этих подсемейств различные типы CAR участка домена EC1. Второе различие подсемейств кадгеринов заключается в строении С-концевого фрагмента. У классических кадгеринов внутриклеточный домен представлен 150-160 аминокислотными остатками, в то время как у LI- и Ksp-кадгеринов – только двадцатью (рисунок 9).

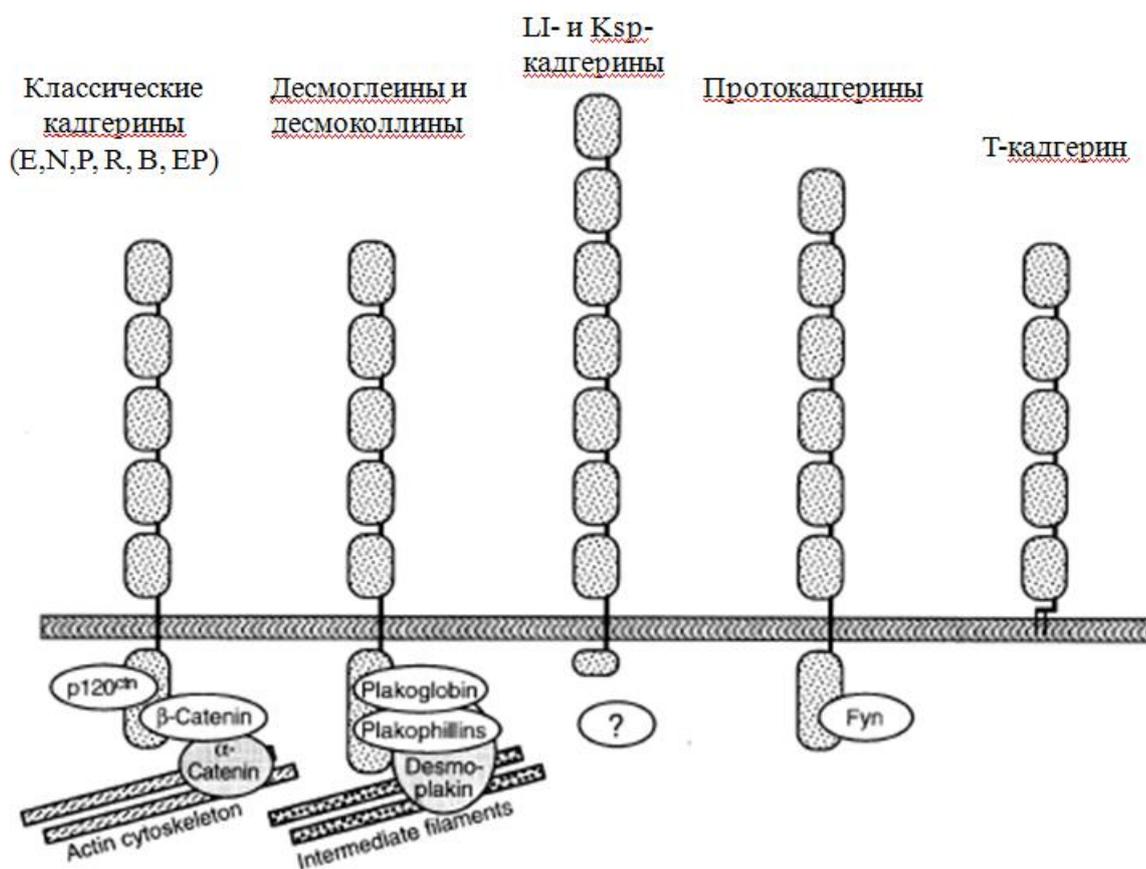


Рисунок 9. Типы кадгериннов (Gessner and Tauber, 2000).

К настоящему времени проведен рентгеноструктурный анализ и получены данные ядерного магнитного резонанса для N-концевых доменов E- и N-кадгериннов. Эти данные позволили установить, что в межклеточной адгезии участвует домен EC1 (Overduin *et al.*, 1995, Shapiro *et al.*, 1995). Кроме того, предполагается, что внеклеточные домены молекул кадгерина одной клетки формируют димеры. В зоне межклеточных контактов образуются связи между димерами молекул кадгерина на поверхности соседних клеток.

Консервативный внутриклеточный домен классических кадгериннов играет центральную роль в адгезии клеток и передаче сигнала (Aberle *et al.*, 1996, Ben-Ze'ev and Geiger, 1998). Было показано, что цитоплазматический фрагмент E-кадгерина формирует динамический комплекс с β -катенином или плакоглобином (γ -катенином). β -катенин и плакоглобин напрямую ассоциированы с α -катенином, который связывает комплексы E-кадгерин/ β -

катенин или E-кадгерин/ γ -катенин с актиновыми филаментами. Таким образом осуществляется внутриклеточное закоривание молекул E-кадгерина (рисунок 10).

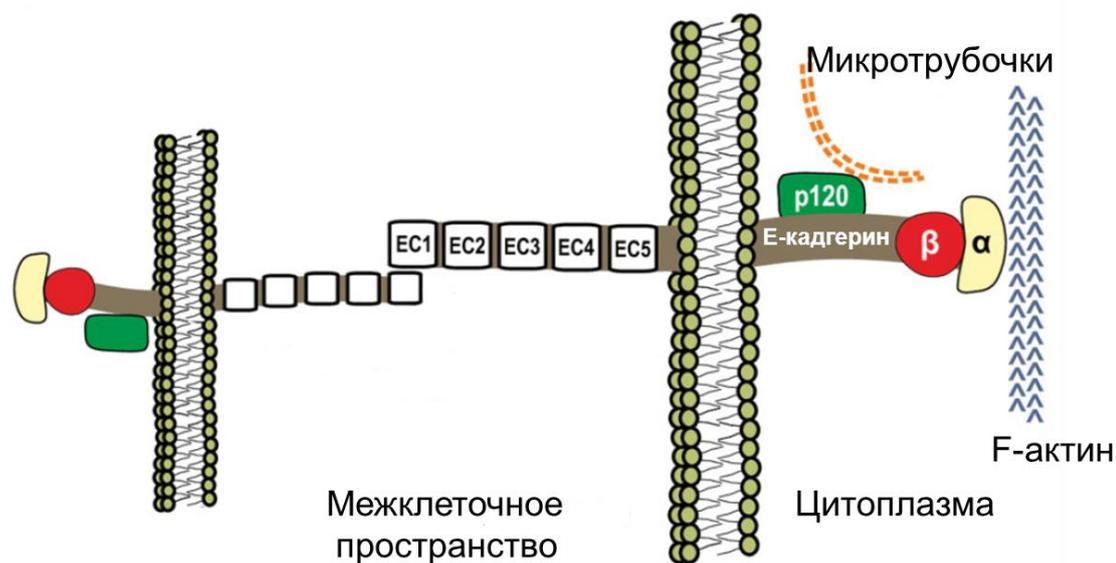


Рисунок 10. Схема строения контакта между клетками (Schneider and Kolligs, 2015). EC – «кадгериновый» домен, α – α -катенин, β – β -катенин.

Экспрессия каждого типа кадгеринов строго регулируется в зависимости от стадии дифференцировки клеток. В клетках кишечного эпителия основным кадгерином является E-кадгерин. E-кадгерин экспрессируется в энтероцитах крипт и ворсинок, а внутри клеток локализуется в зоне клеточных контактов (adherens junction) (Boller *et al.*, 1985, Hermiston and Gordon, 1995). Показано, что утрата функции E-кадгерина в энтероцитах приводит к исчезновению поляризации и приводит к развитию морфологических изменений, характерных для воспалительных заболеваний кишечника (Hermiston and Gordon, 1995). Таким образом, E-кадгерин играет важную роль в функционировании слизистой кишечника.

Клетки способны модифицировать функции мембранных белков путем их протеолиза и высвобождения фрагментов. К настоящему времени известно, что фрагменты, образующиеся при расщеплении E-кадгерина, обладают онкогенными свойствами. В отщеплении внеклеточного домена

участвуют α -секретазы, среди них члены семейства матриксных металлопротеиназ (MMP-3, MMP-7, MMP-9, и MT1-MMP), семейства A Disintegrin and Metalloproteinases (ADAM 10 и ADAM 15), а также плазмин и калликреин (рисунок 11) (De Wever *et al.*, 2007, Maretzky *et al.*, 2005). Таким образом, в результате расщепления полноразмерного E-кадгерина (120 кДа) высвобождается внеклеточный фрагмент с массой 80 кДа (называемый также растворимый E-кадгерин – sE-cad) и образуется С-концевой фрагмент (38 кДа). Внеклеточный фрагмент диффундирует в межклеточное пространство и даже в кровотоки, выступая в роли паракринной и аутокринной сигнальной молекулы.

С-концевой фрагмент (E-cad/CTF1) остается закрепленным в мембране, до того как произойдет его расщепление γ -секретазой (презенелин-1/2). Эти события приводят к разрушению адгезионных контактов и высвобождению в цитозоль 33 кДа фрагмента (E-cad/CTF2) (Ito *et al.*, 1999, Marambaud *et al.*, 2002). В дальнейшем и этот фрагмент может быть расщеплен каспазой 3 с образованием 29 кДа фрагмента (E-cad/CTF3) (рисунок 11).

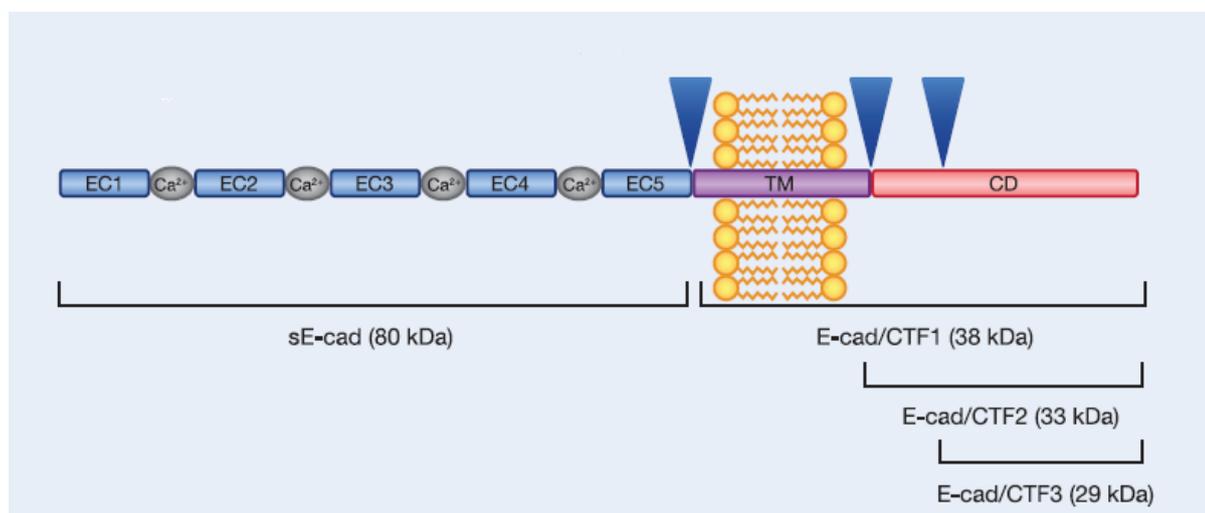


Рисунок 11. Известные участки расщепления E-кадгерина. EC – домены, имеющие укладку, характерную для кадгеринов, TM – трансмембранный домен E-кадгерина, CD – внутриклеточный домен E-кадгерина, синими треугольниками показаны места расщепления E-кадгерина протеиназами (David and Rajasekaran, 2012).

В субконфлюэнтной культуре клеток HT29/C1, обработанной BFT, расщепление E-кадгерина начинается в течение 1 мин и обычно завершается через 1-2 часа. Этот процесс происходит в два этапа: сначала высвобождается эктодомен E-кадгерина, а затем происходит расщепление внутриклеточных фрагментов E-кадгерина, с помощью пресенелин-1/ γ -секретазы клетки хозяина (Wu *et al.*, 2007). E-кадгерин связан внутриклеточным доменом с катенином, ядерным сигнальным белком, участвующем в процессах клеточного роста. Продемонстрировано, что β -катенин играет центральную роль в сигнальном пути Wnt/Wingless (Brown and Moon, 1998). При разрушении E-кадгерина увеличивается уровень несвязанного цитоплазматического β -катенина, что сопровождается его транслокацией в ядро. В ядре β -катенин формирует гетеродимеры с транскрипционными факторами семейства HMG-box LEF/TCF (Behrens *et al.*, 1996, Huber *et al.*, 1996), что приводит к изменению экспрессии определенных генов, в том числе и *c-myc* (He *et al.*, 1998, Mann *et al.*, 1999). Увеличение синтеза *C-myc* способствует пролиферации клеток HT29/C1 (Wu *et al.*, 2003). Также обработанные BFT клетки HT29/C1 обладают большей подвижностью по сравнению с необработанными. Эти данные согласуются с фактами, что снижение количества E-кадгерина у опухолевых клеток повышает их метастатический потенциал. BFT-индуцированная пролиферация колоноцитов и их подвижность согласуются с предположениями об онкогенном потенциале BFT и связью между колонизацией кишечника ETVF и колоректальным раком.

Обработка BFT клеток линии HT29/C1 вызывает высвобождение широкого спектра мембранных белков с течением времени (Wu *et al.*, 2007). Тем не менее, эти белки не были идентифицированы до нашего исследования. Неизвестно также, расщепляет ли BFT эти мембранные белки, или же высвобождение их фрагментов происходит в результате активации BFT какой-либо клеточной сигнальной системы. Проверено экспериментально, что BFT не вызывает расщепления клеточных

поверхностных белков окклюдина (участвует в формировании межклеточных контактов) и β_1 -интегрин (белок базальных мембран клеток эпителия кишечника, обеспечивает адгезию клеток за счет взаимодействия с внеклеточным матриксом) (Wu *et al.*, 1998).

Были предприняты попытки выяснить, расщепляет ли BFT внеклеточный домен E-кадгерина напрямую, или же BFT, связываясь с белками поверхности клеток, активирует другие протеиназы, которые и расщепляют E-кадгерин. Wu S. и коллеги (Wu *et al.*, 1998) трансфицировали L-клетки (фибробласты) плазмидой, несущей ген E-кадгерина под индуцибельным промотором. При обработке этих клеток BFT происходило расщепление E-кадгерина. Основываясь на том, что фибробласты и клетки эпителия, способные к поляризации, имеют разные поверхностные белки, авторы предположили, что BFT расщепляет E-кадгерин напрямую. Однако в этой же работе не наблюдали расщепления рекомбинантного внеклеточного домена E-кадгерина (без 11 C-концевых аминокислот), слитых с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека, при обработке его BFT. Таким образом, вопрос о расщеплении E-кадгерина BFT остается открытым.

1.7. Взаимодействие BFT с поверхностью клеток эпителия

Wu S. с соавторами (Wu *et al.*, 2006) предположили, что на поверхности клеток существует рецептор для BFT. Для проверки этого предположения авторы выделяли BFT и метили его флуоресцентным красителем Alexa-488. После обработки клеток HT-29/C1 меченым BFT было обнаружено его связывание с мембраной, которое сохранялось даже при отмывке буфером, содержащим 150 mM NaCl, 28 mM уксусную кислоту, pH 3,4. Авторы показали, что насыщение связывания происходит при концентрации BFT 3 нМ. При этом связавшийся с поверхностью клеток BFT не замещается немеченым аналогом. При использовании ингибитора металлопротеиназ GM6001 связывания BFT с мембраной не происходит.

В статье обсуждается, возможно ли связывание BFT с E-кадгерином. Если предположить, что BFT связывается с E-кадгерином, то чем больше E-кадгерина содержится на поверхности клеток, тем больше должен быть сигнал от связанного BFT-Alexa488. Однако, в экспериментах с клетками SW480-EC (со сверхэкспрессией E-кадгерина) показано, что это не так. К тому же, если BFT связывается с E-кадгерином, то после расщепления E-кадгерина сигнал от меченого BFT должен пропадать. В работе же (Wu *et al.*, 2006) было показано, что этого не происходит. Авторы предложили несколько возможных моделей взаимодействия BFT с «рецептором» и E-кадгерином:

1. рецептор BFT может находиться вдали от E-кадгерина. Каталитический домен BFT необходим для связывания и процессинга рецептора – это активирует сигнальный каскад в клетках эпителия, что приводит к расщеплению E-кадгерина протеиназами эукариотической клетки;

2. рецептор расположен рядом с E-кадгерином. BFT расщепляет и E-кадгерин, и рецептор. Однако связывание меченого BFT с мембраной происходит не только в местах локализации E-кадгерина;

3. существуют два типа рецепторов с разной биологической активностью: один рядом с E-кадгерином – активный, связывание с ним BFT приводит к активации сигнальных каскадов в клетках эпителия и расщеплению E-кадгерина; другой – на расстоянии от E-кадгерина – способен связывать BFT и нейтрализовать его активность.

Однако для всех этих моделей требуется дополнительная экспериментальная проверка.

A.G. Remacle с соавторами (Remacle *et al.*, 2014), напротив, показали, что BFT не связывается с поверхностью клеток HT-29/C1. Такие различия могут быть связаны с тем, что в работах использовались разные изоформы BFT. Кроме того, в работе Wu S. с коллегами BFT был выделен из культуральной жидкости *B. fragilis*, а в работе A.G. Remacle с соавторами

использовался рекомбинантный белок, полученный в гетерологичной системе *E. coli* и слитый с FLAG-эпитопом, а также с гексагистидиновой последовательностью. Кроме того, в части экспериментов A.G. Remacle с соавторами использовали rgBFT-3, а не зрелый BFT-3. Наличие продомена могло сказаться на связывании BFT с поверхностью клеток.

1.8. Другие эффекты воздействия BFT на эпителиальные клетки

Помимо изменения морфологии эпителиальных клеток, способных формировать поляризованные монослои, и расщепления E-кадгерина на их поверхности, выявлены и другие изменения, происходящие в клетках после обработки BFT.

Показано, что BFT стимулирует синтез белков клетками (Donelli *et al.*, 1996, Koshy *et al.*, 1996), не вызывает высвобождения лактат-дегидрогеназы из клеток, а также входа в клетки прижизненных красителей (трипанового синего или пропидиум йодида) (Chambers *et al.*, 1997, Koshy *et al.*, 1996, Obiso *et al.*, 1997, Wells *et al.*, 1996). Кроме того, синтез ДНК в таких клетках продолжается (Donelli *et al.*, 1996). Таким образом, согласно этим данным, обработка BFT не приводит к гибели клеток. Однако для поляризованных монослоев клеток эпителия кишечника *in vitro* показано, что обработка BFT приводит к отсроченному апоптозу небольшого числа клеток (через 36 ч после обработки BFT). В то же время на начальном этапе после обработки BFT клетки синтезируют антиапоптотический белок (клеточный ингибитор апоптотического белка 2 (сIAP2)) (Kim *et al.*, 2008). После обработки BFT биоптатов кишечника человека наблюдалась отсроченная потеря жизнеспособности клеток и гибель некоторых клеток путем апоптоза (Sanfilippo *et al.*, 1998, Sanfilippo *et al.*, 2000). Следует отметить, что биоптаты различались по времени начала ответа на обработку BFT (от 2 до 18 ч), а также по выраженности морфологических изменений клеток, в том числе в 20% случаев ответа на обработку BFT не наблюдалось (Sanfilippo *et al.*, 1998).

BFT увеличивает проницаемость монослоя эпителиальных клеток (T84, MDCK, HT29, HT29/C1 и Caco-2), при этом наблюдается зависимость увеличения проницаемости от времени инкубации и концентрации BFT (Chambers *et al.*, 1997, Obiso *et al.*, 1997, Sears *et al.*, 1995). Следует отметить полярность действия BFT: при низкой концентрации токсина проницаемость увеличивается быстрее при нанесении BFT на базолатеральные мембраны по сравнению с апикальной (Chambers *et al.*, 1997, Obiso *et al.*, 1997, Riegler *et al.*, 1999, Sears *et al.*, 1995, Wells *et al.*, 1996). Также, базолатеральное, но не апикальное нанесение BFT приводит к выходу хлоридов из клетки (Chambers *et al.*, 1997). Изменения в проницаемости монослоя клеток T84 сопровождаются морфологическими изменениями, при этом апикальное нанесение BFT вызывает относительно медленные (начало проявления - через 6 ч после обработки) точечные изменения апикальной мембраны. В противоположность этому, базолатеральное нанесение BFT вызывает более быстрые (в течение 90 мин) изменения в морфологии всех клеток монослоя, в том числе набухание клеток и исчезновение микроворсинок (Chambers *et al.*, 1997, Koshy *et al.*, 1996). Исчезновение микроворсинок связано с утратой F-актина на апикальном полюсе и его сборкой на базолатеральном полюсе (Chambers *et al.*, 1997). Хотя общее содержание F-актина в клетках, обработанных BFT, не меняется (Donelli *et al.*, 1996, Koshy *et al.*, 1996, Saidi *et al.*, 1997, Saidi and Sears, 1996), показано его перераспределение, с уменьшением количества стресс-фибрилл и конденсацией F-актина на периферии неполяризованных клеток линий HT-29 (Donelli *et al.*, 1996, Koshy *et al.*, 1996). Одновременно с этим, по данным просвечивающей электронной микроскопии, BFT вызывает разрушение промежуточных и плотных контактов – электронно-плотных структур, которые регулируют проницаемость эпителиального монослоя, в то время как десмосомы остаются интактными (Chambers *et al.*, 1997, Sears *et al.*, 1995). Перераспределение F-актина и утрата межклеточных контактов объясняют

увеличение проницаемости монослоя, хотя полный механизм этого явления не выявлен.

Индукцированная BFT проницаемость кишечника может в дальнейшем приводить к экспонированию антигенов бактерий, обитающих в просвете кишечника, подслизистой. Возможно, это объясняет, как BFT способствует развитию воспаления кишечника (Basset *et al.*, 2004, Karin and Greten, 2005, Prindiville *et al.*, 2000, Rabizadeh *et al.*, 2007, Toprak *et al.*, 2006). В дополнение к увеличивающейся проницаемости кишечника, BFT вызывает высвобождение клетками кишечника провоспалительных хемокинов, включая интерлейкин-8 (IL-8), эпителиальный нейтрофил-активирующий белок 78 (ENA-78), белок хемотаксиса моноцитов 1 (MCP-1), онкоген α , связанный с ростом (GRO- α , называемый также CXCL1) (Kim *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2001, Sanfilippo *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2004). Временной промежуток высвобождения этих хемокинов варьирует. Первым высвобождается IL-8 (через 2-4 ч), GRO- α и ENA-78 появляются позже (Kim *et al.*, 2001, Wu *et al.*, 2004). Обработка клеток BFT также индуцирует синтез неактивной формы трансформирующего фактора роста β (TGF- β) клетками кишечника *in vitro* (Sanfilippo *et al.*, 2000). Считается, что неактивный TGF- β в дальнейшем процессируется протеиназами слизистой кишечника в активную форму, которая необходима для восстановления слизистой при патологиях, вызываемых EТBF. Показано, что NF- κ B является центральным регулятором синтеза хемокинов в обработанных BFT клетках кишечника *in vitro* (Kim *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2001, Wu *et al.*, 2004) Kim *et al.*, 2002 (41R).

Wells с коллегами выявили, что обработка BFT клеток линии HT-29 способствует проникновению внутрь них патогенных бактерий, за исключением *Listeria monocytogenes* (Wells *et al.*, 1996). Устойчивость к *L. monocytogenes* может быть объяснена тем, что для проникновения *L. monocytogenes* в клетки необходим E-кадгерин, а обработка клеток BFT приводит к его расщеплению (Mengaud *et al.*, 1996).

1.9. Модель патогенеза заболеваний, вызываемых ЕТВФ

Суммируя все вышеизложенное, С. L. Sears с коллегами (Sears, 2009) предложена модель патогенеза болезней, вызываемых ЕТВФ, представленная на рисунке 12. Точную последовательность сигнальных каскадов, инициированных ВФТ, еще предстоит расшифровать, как и детали того, как и какие конкретные механизмы передачи сигнала вносят вклад в изменение морфологии клеток, экспрессии генов, приводят к расщеплению Е-кадгерина и пролиферации клеток кишечного эпителия. Накопленные к настоящему моменту данные о действии, оказываемом ВФТ на клетки, свидетельствуют в пользу того, что штаммы ЕТВФ могут являться онкогенными и провоспалительными. Ограниченные клинические наблюдения согласуются с этим предположением (Durmaz *et al.*, 2005, Meisel-Mikolajczyk *et al.*, 1999, Meisel-Mikolajczyk *et al.*, 1994, Sears *et al.*, 2008). ЕТВФ заселяет толстую кишку, где секретируют ВФТ. ВФТ, вероятно, взаимодействует со специфичным рецептором кишечных эпителиальных клеток. Происходит расщепление Е-кадгерина. Расщепление Е-кадгерина снижает барьерную функцию слизистой оболочки толстой кишки. Далее активируются системы передачи сигнала с участием β -катенина, тирозинкиназ (ТК), митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК) и NF- κ B. Это приводит к увеличению синтеза С-тус, циклооксигеназы-2 (СОХ-2) и хемокинов/цитокинов, в том числе IL-8 и TGF- β . Экспрессия *c-тус* стимулирует пролиферацию КЭК, по крайней мере, частично (Wu *et al.*, 2003). Высвобождение хемокинов/цитокинов клетками эпителия в подслизистую усиливает воспаление слизистой оболочки в ответ на колонизацию ЕТВФ. Однозначный вклад различных иммунных клеток в этот процесс неизвестен, но данные свидетельствуют о том, что в этом участвуют и полиморфноядерные лейкоциты, и лимфоциты (Kim *et al.*, 2002).

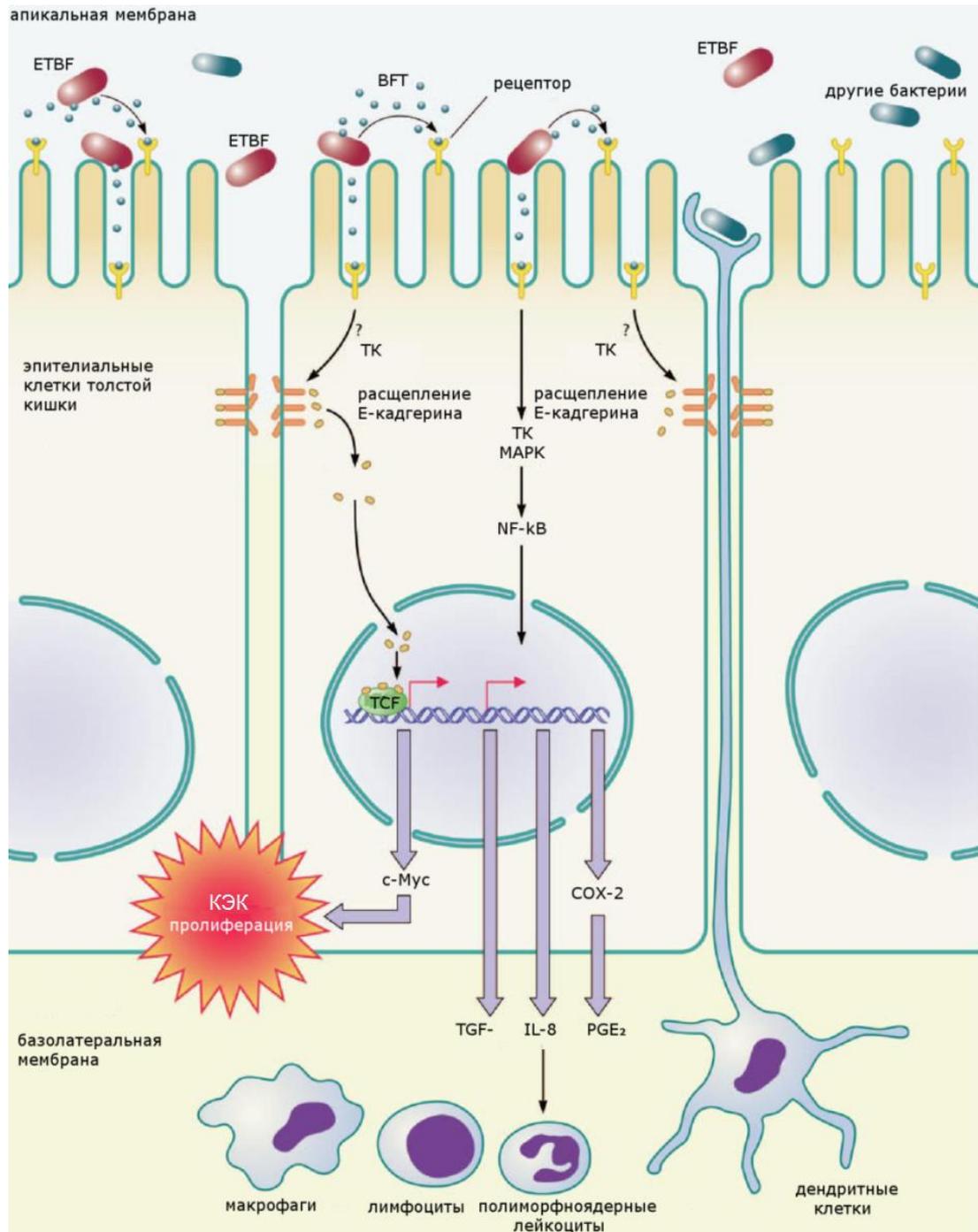


Рисунок 12. Модель патогенеза колита, вызванного ETEC. ТК – тирозинкиназа, MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа, IL-8 – интерлейкин-8, TGF – трансформирующий фактор роста, COX – циклооксигеназа, PGE₂ – простагландин E₂, КЭК – клетки эпителия кишечника (Sears, 2009).

Подводя итог, следует отметить, что данные по субстратной специфичности изоформ BFT, имеющиеся в литературе, неполные и

разрозненные. Имеются данные о VFT-индуцированном высвобождении E-кадгерина, белка, играющего важную роль в межклеточной адгезии, с поверхности клеток эпителия. Считается, что фрагилизин непосредственно расщепляет E-кадгерин, действуя как металлопротеиназа, однако это не было строго показано экспериментальным путем. Поскольку предполагается, что штаммы ETVF обладают провоспалительным и онкогенным потенциалом, то изучение механизмов действия VFT на клетки эпителия кишечника представляется актуальным. Данная диссертационная работа посвящена получению трех изоформ рекомбинантного VFT и исследованию их активности.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

В работе использовали неорганические соли фирм Merck (Германия), Sigma (США) и реактивы квалификации х.ч. и о.с.ч. отечественного производства. Использовали ДНК-маркеры молекулярной массы серии GeneRuler и белковые маркеры молекулярной массы Unstained Protein Molecular Weight Marker фирмы Life Technologies (США). Компоненты среды: триптон, дрожжевой экстракт, агар - производства Amresco, США.

2.2. Штаммы *E. coli* и *B. fragilis*

В работе использовали штаммы *E. coli* B834(DE3) (Novagen, США), BL21(DE3) gold и Top10 (Invitrogen, США), а также клинические изоляты *B. fragilis* BOB25 (ETBF), любезно предоставленный Тараскиной А.Е. (Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия) и 323-J-86 (NTBF), любезно предоставленный Шкопоровым А.Н. (Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия).

2.3. Плазмиды

Использовали плазмиды pET-15b, pET-32a(+), pET-22b(+) (Novagen, США), pBAD/GIII-B и pcDNA3.4 (Invitrogen, США), pGEM-T-easy (Promega, США), pTZ57R/T (Life Technologies, США).

2.4. Линии клеток

В работе были использованы следующие линии клеток: HT-29 (линия клеток аденокарциномы толстого кишечника человека) (ATCC, номер HTB-38, США) и Ecrp293F (линия клеток, полученных из эмбриональной почки

человека, характеризующаяся высоким выходом рекомбинантных белков) (Life Technologies, США).

2.5. Олигодезоксирибонуклеотиды

В работе использовали олигодезоксирибонуклеотиды (НПФ «Литех», Россия). Их последовательности приведены в таблице 4.

Таблица 4.

Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные в данной работе.

Название	Структура 5' ->3'
pBft-Bgl	АТАТАГАТСТАТGGCATGTTCTAATGAAGCTGAT
C-Bft-Sal	ТТААГТСГАСАТСGCCATCTGCTATTTCCCA
C-BFT-Sal1 iso	ТТААГТСГАСАТСGCCATCTGCAGCTTCCCA
C BFT min	ТТААГТСГАССТААТСGCCATCTGCTATTTCCCA
C BFT m1	ТТААГТСГАССТААТСGCCATCTGCAGCTTCCCA
mut E349F	GGTGATGGCACACGCACTAG
mut E349R	СТАГТGCGTGTGCCATCACC
3HisTyrF	TGGCATAСGAАСТАGGGTATATATTGGGTGCTAGGTATGCGGA
3HisTyrR	TCCGCATAССТАGCAСССААТАТАТАССТАGTTСGТATGCCA
cadProF	АТАТАГАТСТСАGAGCCGGAGCCCTGCCA
cadXho R	АТАТСТСГАGГТСGТCCTCGCCGCCTCCGT
Cad-F	АТGGGCCCTTGGAGCCGCA
Cad-Rev	СТАГТСGТCCTCGCCGCCTCCGT
cadFKoz	CGCCACCATGGGCCCTTGGAGCCGCA
1000F	СТАСGТАТАССТАGGTGGTTC

1600R	GAGTGGAAATGGCACCAGTGTC
CMV F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
pcDNA R	CAACATAGTTAAGAATACCAGTC
ufor 601	GTACCTCATGGAATAACTGA
ufor 632	GTGCAGTACCTTCTGAACCT
urev 1000	CCACTGGCTTTAAAATCCGA
urev 1026	TACATCAGCTGGGTTGTAGA
nest F	CATCAGTGGAAATGGGATGAGT
nest R	AGGCAATAACAATCTGCGACTG
Ln1F	GATCCACGTCCGCTGCGTGCGGGTAC
Ln1R	CCGCACGCAGCGGACGTG
Ln2F	GATCCACGTGGACTGCGTGCGGGTAC
Ln2R	CCGCACGCAGTCCACGTG
Ln3F	GATCCACGTCCGCTGGCTGCAGGTAC
Ln3R	CTGCAGCCAGCGGACGTG
Ln4F	GATCCAGCTCCGCTGCGTGCGGGTAC
Ln4R	CCGCACGCAGCGGAGCTG
Ln5F	GATCCAGCTGGACTGGCTGCAGGTAC
Ln5R	CTGCAGCCAGTCCAGCTG
bftNdeF	CATATGGCAGTACCTTCTGAACCTAA
bftBamR	GGATCCCTAATCGCCATCTGCTATTT
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
BADF	GCTATGCCATAGCATT TTTATCC
BADR	TCAGACCGCTTCTGCGTTC
15MCSf	TATGGGATCCCCCGGGGTCGACGGTACCT
15MCSr	GATCAGGTACCGTCGACCCCGGGGGATCCCA

2.6. Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили в амплификаторе DNA EngineTetrad® 2 ThermalCycler (Bio-Rad, США) в объеме 20-25 мкл при 2-3 мМ MgCl₂ 0,2 мМ каждого из dNTP, 67 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 16,7 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,5 ед. Taq-полимеразы (ThermoScientific, США), 1-10 нг ДНК, 5 пмоль каждого праймера. Детекцию результатов ПЦР проводили при помощи горизонтального электрофореза в 1-2% агарозном геле.

2.7. Реакция рестрикции

Рестрикция ДНК проводилась в объеме 25-50 мкл, содержащем 0,5-3 мкг ДНК, соответствующие эндонуклеазы рестрикции (Life Technologies, США) (необходимое количество единиц активности рассчитывалось исходя из количества ДНК, взятой в реакцию) и буфер, рекомендованный производителем. Реакции проводили при 37^oС в течение 1,5 ч. Детекцию результатов рестрикции проводили при помощи горизонтального электрофореза в 1-2% агарозном геле.

2.8. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля

Участки агарозного геля, содержащего целевые фрагменты ДНК, вырезали при длинноволновом ультрафиолетовом облучении. Фрагменты ДНК длиной более 3000 п.н. выделяли из геля с использованием набора GeneJet Gel Extraction Kit (Life Technologies, США) согласно инструкции производителя. Фрагменты ДНК длиной до 3000 п.н. выделяли центрифугированием на микроколонках со стеклянным фильтром (5500g, 10 мин).

2.9. Реакция лигирования

Лигирование проводили в объеме 10-15 мкл, содержащем 25-50 нг плазмидной ДНК и амплифицированного фрагмента, предварительно

обработанных соответствующими эндонуклеазами рестрикции, 1 ед. T4 ДНК-лигазы (Life Technologies, США) и буфер, рекомендованный производителем. Использовали молярное соотношение вектор:вставка от 1:3 до 1:8. Реакцию проводили при 25 °С в течение 1 ч.

2.10. Культивирование клеточных культур *E. coli* и трансформация их плазмидной ДНК

Культивирование клеток *E. coli* проводили в жидкой среде LB (1% бакто-триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl) и на твердом LB-агаре (1% бакто-триптона, 0,5% дрожжевого экстракта 1% NaCl и 1,5% бактоагара) с добавлением при необходимости соответствующего антибиотика. Получение компетентных клеток лабораторных штаммов *E. coli* B834(DE3), BL21(DE3) gold и Top10 и трансформацию рекомбинантной плазмидной ДНК проводили по методу Hanahan (Hanahan, 1983). Для отбора рекомбинантных клонов использовали метод скрининга с использованием изопропил-β-D-тиогалактозида и X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид) и методы контрселекции на средах с антибиотиками (100-150 мкг/мл ампициллина)

2.11. Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК из *E. coli* проводили согласно протоколу, представленному в (Sambrook *et al.*, 1989). Для определения концентрации полученной плазмидной ДНК использовали электрофорез в агарозном геле.

2.12. Определение нуклеотидной последовательности генома энтеротоксигенного изолята *V. fragilis*

Определение полной нуклеотидной последовательности генома *V. fragilis* изолята BOB25 (любезно предоставлен Тараскиной А.Е. (Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия)) проводили в лаборатории

постгеномных исследований в биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России двумя способами. Одну библиотеку фрагментов секвенировали с использованием GS FLX+ genome sequencer (Roche 454 Life Science, США), другую – с использованием PGM sequencer system (Applied Biosystems, США). Первичную сборку осуществляли с помощью программы Newbler version 2.9. Для определения нуклеотидных последовательностей, находящихся между прочтенными, получали соответствующие ампликоны и определяли их последовательность, используя ABI Prism Genetic Analyzer 3730XL, согласно инструкции фирмы-производителя (Applied Biosystems, США).

2.13. Скрининг ДНК из образцов кала на наличие последовательностей, кодирующих VFT-1 и VFT-3

Образцы ДНК из кала человека были любезно предоставлены Шкопоровым А.Н. (Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия) и Кострюковой Е.С. (лаборатория постгеномных исследований в биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, образцы получены в рамках проекта «Метагеном кишечника человека»). Для выявления в ДНК из образцов кала последовательностей, кодирующих VFT 1 и 3, использовали «гнездовую» ПЦР. Для первого раунда ПЦР использовали пару праймеров ufor 601 - urev 1026. Режим амплификации ($^{\circ}\text{C}/\text{сек.}$): 95/180 – 1 цикл; 95/10, 55/10, 72/30 – 35 циклов. Для второго раунда использовали праймеры ufor 632 - urev 1000 (таблица 4) и программу ($^{\circ}\text{C}/\text{сек.}$): 95/180 – 1 цикл; 95/10, 55/10, 72/30 – 25 циклов. Продукты реакции разделяли в агарозном геле и выделяли. Нуклеотидную последовательность полученных ампликонов определяли с помощью секвенирования с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 на автоматическом анализаторе ДНК AbiPrism 3730xl («AppliedBiosystems», США).

2.14. Получение фрагментов ДНК, кодирующих ргВFT 1, 2 и 3

Образцы ДНК из кала, в которых были выявлены последовательности, кодирующие изоформы 1 и 3 ВFT, использовали для получения полноразмерного фрагмента, кодирующего пробелок. Первый раунд «гнездовой» ПЦР проводили с праймерами nestF и nestR ($^{\circ}\text{C}/\text{сек.}$: 95/180 – 1 цикл; 95/10, 62/10, 72/90 – 35 циклов.). Для проведения второго раунда использовали пары праймеров pBft-Bgl/C-Bft-Sal1 iso для первой изоформы ВFT и pBft-Bgl/C-Bft-Sal для третьей изоформы ($^{\circ}\text{C}/\text{сек.}$: 95/180 – 1 цикл; 95/10, 58/10, 72/90 – 25 циклов.).

Участок ДНК, кодирующий полноразмерный ВFT-2 (продомен и каталитический домен, без сигнального пептида), был амплифицирован с использованием пары олигонуклеотидов pBft-Bgl и C-Bft-Sal и ДНК энтеротоксигенного штамма *B. fragilis* в качестве матрицы.

Продукты ПЦР разделяли в 1% агарозном геле и выделяли.

2.15. Конструирование экспрессионных векторов, кодирующих ВFT, слитый с полигистидиновой последовательностью

2.15.1. Клонирование ДНК-фрагмента, кодирующего каталитический домен ВFT-2

ДНК-фрагмент, кодирующий каталитический домен ВFT-2, был амплифицирован с использованием пары олигонуклеотидов bftNdeF и bftBamR и ДНК энтеротоксигенного штамма *B. fragilis* в качестве матрицы (изолят ВОВ25, любезно предоставленный Тараскиной А.Е. (Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия). Продукт амплификации был клонирован в Т-вектор pGEM-T-easy в соответствии с рекомендациями производителя (Promega, США). Полученный вектор обрабатывали эндонуклеазами *NdeI* и *BamHI* (МВІ Fermentas, Литва) и выделяли целевой ДНК-фрагмент путем препаративного электрофореза, после чего лигировали совместно с

плазмидой pET-15b, предварительно гидролизованной теми же ферментами. Продуктами реакции лигирования трансформировали клетки *E.coli* Top 10. Трансформанты рассеивали на чашки Петри с использованием ампициллина в качестве селективного маркера. С помощью ПЦР с использованием праймеров T7 и T7t были отобраны клоны, содержащие плазмиды с целевой вставкой. Далее из них выделяли плазмидную ДНК. В результате была получена плазида pET15b-bft, несущая последовательность ДНК, кодирующую каталитический домен BFT-2.

2.15.2. Клонирование ДНК-фрагментов, кодирующих prBFT-1, 2, 3

Полученные фрагменты ДНК (см. п. 2.14) обрабатывали эндонуклеазами *Bgl*III и *Sal*I (Life Technologies, США) совместно с плазмидой pBAD/GIII-B (Invitrogen, США), после чего подвергали лигированию, продуктами реакции трансформировали клетки *E.coli* Top 10. Трансформанты рассеивали на чашки Петри с использованием ампициллина в качестве селективного маркера. С помощью ПЦР с использованием праймеров BAD F и BAD R были отобраны клоны, содержащие плазмиды, имеющие целевую вставку. В результате были получены плазмиды pBAD/GIII-prBft1, pBAD/GIII-prBft и pBAD/GIII-prBft3, несущие последовательности ДНК, кодирующие полноразмерные BFT, слитые с сигнальным пептидом белка GIII бактериофага fd и полигистидиновой последовательностью с С-конца.

Для получения плазмиды pETmin/prBFT-His, кодирующей полноразмерный prBFT-2 (без сигнального пептида), слитый с С-концевой последовательностью из шести остатков гистидина, мы провели ПЦР, используя плазмиду pBAD/GIII-prbft в качестве матрицы и олигонуклеотиды BAD F и BAD R в качестве праймеров. Ампликоны обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Bgl*III и *Sal*I и клонировали в вектор pETmin, предварительно обработанный *Bam*HI и *Sal*I.

Плазмида pETmin была сконструирована на основе коммерческой плазмиды pET-22b(+). Плазмиду pET-22b(+) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *VamHI*. Затем плазмиду добавляли к раствору, содержащему эквимольные количества олигонуклеотидов 15MCSf и 15MCSr в молярном соотношении олигонуклеотид:плазмида 2000:1. После проведения лигирования полученной смесью трансформировали клетки *E. coli* Top10.

2.16. Конструирование плазмид, кодирующих prBFT-1,2,3 без полигистидиновых последовательностей

Для конструирования плазмид, кодирующих prBFT без полигистидиновой последовательности, были амплифицированы фрагменты ДНК с использованием в качестве матрицы плазмид pBAD/GIII-prBft и pBAD/GIII-prBft3 и праймеров pBft-Bgl и C BFT min. При использовании в качестве матрицы pBAD/GIII-prBft1 праймер C BFT min был заменен на C BFT m1. Праймеры C BFT min и C BFT m1 позволяют ввести стоп-кодон перед последовательностью, кодирующей шесть остатков гистидина. Далее действовали аналогично п. 2.15.2. Были получены плазмиды pBAD/GIII-prBft1-min, pBAD/GIII-prBft2-min, pBAD/GIII-prBft3-min, кодирующие полноразмерные BFT 1, 2, 3 без полигистидиновых последовательностей, слитые с сигнальным пептидом белка GIII бактериофага fd.

2.17. Сайт-направленный мутагенез

Для получения мутантных форм BFT использовали праймеры, указанные в таблице 5. Для ПЦР №№1-8 использовали следующий режим (°C/сек.): 95/120 – 1 цикл; 95/10, 58/10, 72/40 – 25 циклов.

Амплифицированные фрагменты разделяли в агарозном геле и выделяли. Затем по 10 нг выделенных фрагментов объединяли попарно (продукты ПЦР№1+продукты ПЦР№2 (пробирка а), №3+№4 (b), №5+№6 (c), №7+№8 (d)). Проводили денатурацию, отжиг фрагментов и их элонгацию. Режим

достройки фрагментов ($^{\circ}\text{C}/\text{сек.}$): 94/120 – 1 цикл; 94/10, 68/10, 72/40 – 10 циклов. После этого в пробирки а, b и d вносили по 10 пмоль праймеров pVft-Bgl и C BFT min, в пробирку с - pVft-Bgl и CBFT m1 и помещали в амплификатор при следующих параметрах ($^{\circ}\text{C}/\text{сек.}$): 94/120 – 1 цикл; 94/10, 58/10, 72/90 – 25 циклов.

Таблица 5.

Праймеры, использованные для сайт-направленного мутагенеза последовательностей, кодирующих изоформы BFT.

Замены остатков аминокислот	№ ПЦР	Названия праймеров	Матрица
E349A	ПЦР №1	mut E349F, C BFT min	pBAD/GIII-prbft2-min
	ПЦР №2	mut E349R, pVft-Bgl	
	ПЦР №3	mut E349F, C BFT min	pBAD/GIII-prbft3-min
	ПЦР №4	mut E349R, pVft-Bgl	
	ПЦР №5	mut E349F, C BFT m1	pBAD/GIII-prbft1-min
	ПЦР №6	mut E349R, pVft-Bgl	
H348Y, H352Y, H358Y	ПЦР №7	3HisTyrF, C BFT min	pBAD/GIII-prbft2-min
	ПЦР №8	3HisTyrR, pVft-Bgl	

Полученные фрагменты разделяли в агарозном геле и выделяли, далее обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Bgl*III и *Sal*I и клонировали в плазмиду pBADGIII-B, как описано в п. 2.15.2. В результате были получены плазмиды, кодирующие мутантные формы pVBFT:

- с заменами каталитического остатка глутаминовой кислоты на остаток аланина: pBADGIII-B-prbft1-E349A, pBADGIII-B-prbft2-E349A, pBADGIII-B-prbft3-E349A;

- с заменами остатков гистидина, хелатирующих ион цинка, на остатки тирозина: pBADGIII-B-prbft2-HY.

2.18. Конструирование плазмид, кодирующих потенциальные субстраты для BFT

2.18.1. Конструирование плазмид для получения E-кадгерина в *E. coli* и культуре клеток человека Expi293F

кДНК E-кадгерина была получена из линии клеток HT-29 с использованием SV Total RNA Isolation System (Promega, США) и обратной транскриптазы M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, США), согласно инструкциям фирмы-производителя. Для амплификации последовательности, кодирующей полноразмерный E-кадгерин с сигнальным пептидом, использовали пару праймеров Cad-F и Cad-Rev. Полученный ПЦР-продукт клонировали в вектор pTZ57R/T (Life Technologies, США). В результате получили плазмиду pTZ-cadHT, содержащую последовательность, кодирующую полноразмерный E-кадгерин с сигнальным пептидом.

Для получения рекомбинантного E-кадгерина в *E. coli* был сконструирован вектор на основе плазмиды pET-min. Был получен ПЦР – продукт с использованием праймеров cadPro F и cadXho R и плазмиды pTZ-cadHT в качестве матрицы. ПЦР-продукт разделяли в агарозном геле и выделяли. Затем ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Bgl*III и *Xho*I и далее клонировали в плазмиду pETmin, обработанную *Bam*HI и *Sal*I. Полученный вектор pCad-min содержал последовательность, кодирующую полноразмерный E-кадгерин без сигнального пептида, слитый с С-конца с шестью остатками гистидина.

В плазмиду pcDNA3.4. (LifeTechnologies, США), предназначенную для экспрессии в клетках эукариот, клонировали последовательность, кодирующую полноразмерный E-кадгерин с сигнальным пептидом и шестью остатками гистидина на С-конце. Для получения этой последовательности

провели ряд ПЦР. Для первой реакции использовали матрицу рTZ-cadHT и праймеры cadFKoz и 1600R. Для второй – матрицу рCad-min и пару нуклеотидов 1000F и T7t. Продукты ПЦР разделяли в агарозном геле и выделяли. После этого выделенные фрагменты (имеющие зону перекрытия) смешивали, проводили плавление, отжиг и достройку. После этого в смесь добавляли праймеры cadFKoz и T7t и проводили ПЦР. В праймер cadFKoz введена последовательность Козак, необходимая для эффективной инициации трансляции в клетках эукариот, поскольку вектор для экспрессии в клетках млекопитающих рсDNA™3.4-ТОРО® не содержит ее. Амплифицированную целевую последовательность, кодирующую полноразмерный E-кадгерин с сигнальным пептидом и шестью остатками гистидина на С-конце, клонировали в вектор рсDNA™3.4-ТОРО® согласно инструкции фирмы-производителя. Поиск клонов, содержащих плазмиду с целевой вставкой, осуществляли с использованием праймеров CMV F и рсDNA R, для определения ориентации вставки – праймеры cadKozF и рсDNA R. Полученную плазмиду назвали рсDNA3.4-cad.

2.18.2. Получение гена тиоредоксина с линкером, кодирующим предполагаемый сайт расщепления для BFT

Олигонуклеотиды Ln1F-Ln1R, Ln2F-Ln2R, Ln3F-Ln3R, Ln4F-Ln-4R, Ln5F-Ln5R попарно отжигали и клонировали в вектор рЕТ32a(+), предварительно обработанный эндонуклеазами рестрикции *Bgl*III и *Kpn*I. Были получены конструкции рЕТ-Trx-Ln1, рЕТ-Trx-Ln2, рЕТ-Trx-Ln3, рЕТ-Trx-Ln4, рЕТ-Trx-Ln5.

2.19. Нарботка рекомбинантных BFT

Плазмидой рЕТ15b-bft трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма B834(DE3), трансформантов высевали на агаризованную среду LB с ампициллином (150 мкг/мл) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Колонии инокулировали в 100мл среды LB (ампициллин 150 мкг/мл),

культивировали до $OD_{600} \sim 0,8$ при $37^{\circ}C$. Экспрессию гена индуцировали добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) (Thermo Scientific, США) до концентрации 0,5 мМ. После добавления индуктора температуру культивирования снижали до $30^{\circ}C$ и культивировали индуцированную культуру 4-5 часов. Клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 15 мин), промывали небольшим объемом охлажденного 1^{\times} PBS и разрушали ультразвуком, следуя рекомендациям производителя прибора. Полученный лизат центрифугировали (15000 g, 25 мин). Осадок двукратно промывали 1% (об.) раствора Triton X-100 и хранили при $-20^{\circ}C$.

Плазмидами, полученными на основе pBAD/GIII, кодирующими последовательности prBFT дикого типа, а также мутантных prBFT, трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма Top10, трансформантов высевали на агаризованную среду LB. Единичную колонию пересеивали в 10 мл среды LB, культивировали в шейкере инкубаторе 16 ч и 180 об/мин. Полученную культуру переносили в 1 л среды LB и подращивали до $OD_{600} \sim 0,8$. Экспрессию гена индуцировали добавлением арабинозы до концентрации 2 г/л, после чего инкубировали культуру 4 часа. Температура культивирования во всех случаях составляла $37^{\circ}C$, в среде присутствовал ампициллин (150 мкг/л). Клетки из 1 л культуры собирали центрифугированием (3000 g 15 мин), ресуспендировали в 50 мл буфера TE (10 мМ TrisCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0) и разрушали с помощью дезинтегратора Branson Sonifier 250 (VWR Scientific, США), следуя рекомендациям производителя прибора. Полученный лизат центрифугировали (50000 g, 15 мин), осадок двукратно промывали в 50 мл 1% (об.) раствора Triton X-100 и хранили при $-20^{\circ}C$.

Штамм *E. coli* BL21(DE3) gold трансформировали плазмидой pETmin/prBFT-His. 100 мл LB (содержащей ампициллин 150 мкг/мл) инокулировали единичной колонией и растили при $37^{\circ}C$ в шейкере при 180 об/мин в течение 4-5 ч. Затем полученную культуру переносили в 3 л 2^{\times} LB (NaCl – 5 г/л), содержащие 10 мМ лактозу, и культивировали в течение ночи

при 25°C в ферментере BIOFLO 110 Fermentor/Bioreactor (New Brunswick Scientific, США). Затем клетки из 3 л культуры собирали центрифугированием (3000 g), трижды промывали 1^x PBS и ресуспендировали в 40 мл дистиллированной воды. Клетки разрушали ультразвуком и добавляли к лизату PMSF до 2 мМ. Лизат осветляли центрифугированием (50000 g, 25 мин). Супернатант отбирали и добавляли к нему 8^x PBS до 1^x. Далее незамедлительно проводили метал-хелатную аффинную хроматографию.

2.20. Выделение и процессинг рекомбинантных BFT, слитых с последовательностью из шести остатков гистидина

Для выделения prBFT аликвоту суспензии телец включения, полученную из 1 л исходной культуры, осаждали центрифугированием (50000 g, 15 мин) и растворяли в 20 мл буфера А (20 мМ Na⁺-фосфатный буфер, 8 М мочевины, 0,5 М NaCl, 10 мМ имидазол, pH 7,4) с добавлением 0,01% (об.) β-меркаптоэтанола. Раствор осветляли центрифугированием (50000 g, 15 мин) и наносили на колонку, содержащую 5 мл сорбента Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, США). После нанесения колонку промывали 50 мл исходного буфера при скорости потока 1 мл/мин, а затем элюировали связавшиеся с сорбентом полипептиды буфером Б (20 мМ Na⁺-фосфатный буфер, 8 М мочевины, 0,5 М NaCl, 500 мМ имидазол, pH 7,4). Полученную в результате хроматографии фракцию (объем 5-7 мл) разводили буфером А до объема 50 мл, добавляли 5 мкл β-меркаптоэтанола, а затем двукратно диализовали против 1 л 1^x PBS при +10°C в течение 12 ч. Для перевода рефолдированного prBFT в активную форму к полученному раствору добавляли трипсин (Invitrogen, США) до конечной концентрации 1-2 мкг/мл и инкубировали при 37°C 1-1,5 ч (для каждой партии рефолдированного белка условия подбирались индивидуально). Вслед за этим препарат сразу наносился на колонку с Ni Sepharose High Performance, использованную ранее для выделения пробелка и уравновешенную буфером

В (20 мМ Na⁺-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, 10 мМ имидазол, рН 7,4). После нанесения, колонку промывали 50 мл исходного буфера В, а затем элюировали связавшиеся с сорбентом полипептиды буфером Г (20 мМ Na⁺-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, 250 мМ имидазол, рН7,4). Активированный ВFT переводили в 1^x PBS с использованием готовой колонки HiTrap Desalting 5 ml (GE Healthcare, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Очистку рекомбинантного каталитического домена ВFT проводили аналогично, использовали тельца включения, полученные со 100 мл культуры. Полученную в результате хроматографии фракцию (1-2 мл) диализовали против 500 мл 1^x PBS при +10°C в течение 12 ч.

рВFT из растворимой фракции клеток *E.coli* BL21(DE3) выделяли следующим образом. Фракцию наносили на колонку, заполненную 5 мл Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, США). Колонку промывали 50 мл буфера В при скорости потока 1 мл/мин и связавшиеся полипептиды элюировали буфером D. Получившийся образец диализовали против 500 мл 1^x PBS при 10 °С в течение 12 ч. Следующие стадии (процессинг, метал-хелатная аффинная хроматография и гель-фильтрация) были такими же, как и в случае рВFT, рефолдированного из телец включения.

2.21. Выделение и процессинг рекомбинантных ВFT, без последовательности из шести остатков гистидина

Для выделения рВFT без полигистидиновой последовательности аликвоту суспензии телец включения, полученную из 1л исходной культуры, осаждали центрифугированием и растворяли в 20 мл буфера А с добавлением 0,1% (об.) β-меркаптоэтанола, также, как и в случае выделения рВFT, слитых с гексагистидиновой последовательностью. Раствор осветляли центрифугированием (50000 g, 15 мин) и диализовали против 500 мл 1^x PBS с добавлением 0,1% (об.) β-меркаптоэтанола при +10°C в течение 12 ч. После этого проводили ограниченный трипсинолиз белков. Для этого к

диализованному препарату телец включения добавляли трипсин (Invitrogen, США) до конечной концентрации 1-2 мкг/мл и инкубировали при 37°C 1-1,5 ч (для каждой партии рефолдированного белка условия подбирались индивидуально). Затем к образцу добавляли PMSF до конечной концентрации 2 мМ для инактивации трипсина. Вслед за этим препарат сразу наносился на колонку с 5 мл сорбента Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером В (20 мМ Na⁺-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, 10 мМ имидазол, pH 7,4). После нанесения, колонку промывали 50 мл исходного буфера В, а затем элюировали связавшиеся с сорбентом полипептиды буфером D (20 мМ Na⁺-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, 50 мМ ЭДТА). После этого проводили гель-фильтрацию с использованием готовой колонки HiTrap Desalting 5 ml. Далее в работе в названиях белков будут использоваться сокращения rgBFT – для обозначения rgBFT, состоящего из продомена и каталитического домена, и mBFT – для обозначения зрелого BFT, полученного из пробелка.

2.22. Определение N-концевой последовательности BFT-2

Определение N-концевой последовательности зрелого BFT-2, полученного из рекомбинантного пробелка, проводили методом секвенирования по Эдману. После электрофореза препарата BFT-2 в 15% ПААГ по Лэммли осуществляли полусухой перенос на PVDF мембрану. Мембрану окрашивали Ponceau S (Amresco, США), отмечали положение BFT-2, отмывали мембрану дистиллированной водой от красителя и вырезали области, соответствующие BFT-2. Определение N-концевой последовательности проводили методом ступенчатой деградации по Эдману на автоматическом секвенаторе Procise 492 (Applied Biosystems, США) по методике фирмы-изготовителя. Работа была выполнена в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

2.23. Гель-фильтрация

Для определения олигомерного статуса ВФТ использовали гель-фильтрацию (ГФ). ГФ проводили на колонке Tricorn 10/300, заполненной сорбентом Superdex 200 (Amersham, Швеция). Колонку уравнивали буфером, содержащим 20 мМ фосфата натрия и 8 г/л хлорида натрия, рН 7,4. Скорость потока буфера – 1 мл/мин, объем вносимой пробы – 0,1 мл, содержащих целевого белка – 1 мг. Калибровку колонки осуществляли с помощью маркеров Gel Filtration Calibration Kit LMW (GE Healthcare, США) в полном соответствии с рекомендациями производителя. Все операции выполняли на хроматографе АКТА FPLC (GE Healthcare, США).

2.24. Получение рекомбинантного Е-кадгерина в *E.coli*

Клетки *E. coli* штамма В834 (DE3) трансформировали плазмидным вектором рCad-min и высевали на чашки, содержащие агаризованную среду LB и ампициллин (150 мкг/мл). Затем единичной колонией инокулировали 2 мл среды LB (ампициллин 150 мкг/мл). Культуру подращивали в течение ночи при 37° С. Полученной культурой инокулировали 200 мл среды LB, содержащей ампициллин (150 мкг/мл), и растили при температуре 37° С и постоянном встряхивании до достижения культурой оптической плотности $OD_{600} \sim 2$. Индуцировали синтез белка добавлением IPTG до конечной концентрации 1,0 мМ. Затем клетки дополнительно культивировали в течение 2 ч при 37° С. Клетки разрушали ультразвуком, лизат центрифугировали и рекомбинантный белок выделяли с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии из телец включения. Полученную фракцию после металл-хелатной аффинной хроматографии диализовали против 20 мМ Tris-HCl, рН 8,0, при 10° С в течение 12 ч. После диализа рекомбинантный Е-кадгерин оставался растворимым.

2.25. Получение рекомбинантного Е-кадгерина в Expi 293F

Плазмидой pcDNA3.4-cad трансфицировали с использованием реагента Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, США) линию клеток Expi293F и культивировали согласно инструкции фирмы-производителя (Expi293™ Expression System Kit, LifeTechnologies, США). Через 48 часов отбирали пробу для анализа клеток на наличие Е-кадгерина методом вестерн-блот гибридизации. Оставшуюся суспензию клеток (30 мл, концентрация клеток – 2×10^6 клеток/мл), разделяли на две пробирки, центрифугировали при 200 g в течение 5 мин, супернатант сливали, клетки замораживали при -70°C .

Для выделения Е-кадгерина одну из пробирок с клетками размораживали во льду и клетки растворяли в 10 мл буфера А. Раствор осветляли центрифугированием (50000 g, 15 мин) и наносили на колонку, содержащую 5 мл сорбента Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, США). После нанесения, колонку промывали 50 мл исходного буфера при скорости потока 1 мл/мин, а затем элюировали связавшиеся с сорбентом полипептиды буфером С (20 mM Na^+ -фосфатный буфер, 8 M мочевины, 0,5 M NaCl, 500 mM имидазол, pH 7,4). Полученные в результате хроматографии фракции анализировали на содержание Е-кадгерина методом вестерн-блот гибридизации. Необходимый объем фракции, содержащей Е-кадгерин, диализовали против 1^x PBS, pH 7,4 при $+10^\circ\text{C}$ в течение 16-20 часов. Е-кадгерин при этом оставался в растворенной форме. Диализованный препарат сразу использовали для определения активности ВФТ к выделенному Е-кадгерину.

2.26. Получение фракций, обогащенных Е-кадгеринном, из клеток линии НТ-29

Клетки НТ-29 (ATCC, номер НТВ-38, США) рассеивали в культуральные флаконы (25 cm^2) в среде DMEM (LifeTechnologies, США) с 10% FBS (Gibco, США), 2 mM GlutaMax (LifeTechnologies, США), 50 мкг/мл

гентамицин (LifeTechnologies, США) и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 48 часов после пересева среду удаляли, к клеткам добавляли 1^x PBS с 5 мМ ЭДТА и помещали в CO₂ инкубатор на 15 мин. После этого клетки собирали, переносили в пробирки и центрифугировали 5 мин при 200 g. Затем к осадку добавляли 1 мл 1^x PBS с 2 мМ PMSF, замораживали при -20°C, после этого давали образцу оттаять. Пробы центрифугировали 10 мин при 12000 g, супернатант удаляли, к осадку добавляли 1 мл 1^x PBS с 2 мМ PMSF и повторяли циклы замораживания/оттаивания/центрифугирования еще 2 раза. Получившийся осадок промывали 500 мкл 1^x PBS с 2 мМ PMSF три раза и обрабатывали следующим образом:

1) осадок клеток, полученный с 1,5 культуральных флаконов (25 см²) растворяли в 300 мкл 1% TritonX-100 и центрифугировали 10 мин при 12000 g. Супернатант отбирали и анализировали на содержание E-кадгерина методом Вестерн-блот гибридизации с использованием в качестве первичных антител IgG мыши к E-кадгерину (LifeTechnologies, США). Часть супернатанта диализовали против 1^x PBS в течение 12 ч при +10°C;

2) осадок клеток, полученный с 1,5 культуральных флаконов (25 см²) суспендировали в 450 мкл 1^x PBS и обрабатывали ультразвуком помощью дезинтегратора Branson Sonifier 250 (VWRScientific, США) в течение 1 мин при следующих параметрах: output control – 3, duty cycle – 50, при охлаждении во льду.

Таким образом, мы получили из клеток линии HT-29:

- обогащенную фракцию мембранных белков, растворенную в TritonX-100 и ее же, переведенную в 1^x PBS путем диализа;
- обогащенную фракцию мембран в виде суспензии.

Полученные препараты незамедлительно использовали для определения активности BFT.

2.27. Получение тиоредоксина с предполагаемым сайтом расщепления для ВФТ

Плазмидами рЕТ-Trx-Ln1, рЕТ-Trx-Ln2, рЕТ-Trx-Ln3, рЕТ-Trx-Ln4, рЕТ-Trx-Ln5, а также исходной плазмидой рЕТ-32a(+) трансформировали штамм *E.coli* BL21 (DE3). 50 мл среды LB (ампициллин 150 мкг/мл) инокулировали ночной культурой и подращивали 2 часа при 37°C (OD₆₀₀ ~ 0,8). Экспрессию гена индуцировали добавлением IPTG (Thermo Scientific, США) до конечной концентрации 1 мМ. После добавления индуктора культивировали клетки 4 ч при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 15 мин), суспендировали в 2,5 мл буфера В и разрушали с помощью дезинтегратора Branson Sonifier 250 (VWRScientific, США). Полученный лизат центрифугировали (50000 g, 15 мин) и супернатант наносили на колонку, содержащую 5 мл сорбента Ni Sepharose High Performance. После нанесения, колонку промывали 50 мл исходного буфера при скорости потока 1 мл/мин, а затем элюировали связавшиеся с сорбентом полипептиды буфером Е (20 мМ Na⁺-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, 500 мМ имидазол, рН 7,4). Далее для смены буфера на 1^x PBS проводили гель-фильтрацию выделенных белков с использованием готовой колонки HiTrap Desalting 5 ml.

2.28. Масс-спектрометрический анализ рекомбинантных белков

Масс-спектрометрический анализ рекомбинантных белков был выполнен в лаборатории протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле проводили следующим образом: вырезанный фрагмент геля размером около 2мм³ дважды промывали для удаления красителя путем инкубации в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0,1 М NH₄HCO₃ в течение 30 мин при 37°C. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли по 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив фрагмент геля, добавляли к нему 4 мкл раствора модифицированного трипсина с концентрацией 12,5

мкг/мл (Trypsin Gold, Promega, США), содержащего 40 мМ NH_4HCO_3 и 10% ацетонитрил. Гидролиз проводили в течение 16 ч при 37 °С, затем к раствору добавляли 8 мкл 0,5 % трифтороуксусной кислоты (ТФУ) и тщательно перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

Для проведения масс-спектрометрического анализа на мишени-подложке смешивали по 2 мкл раствора образца и 0,3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Brucker Daltonics, 75 мг/мл в 30% ацетонитриле, 0,5% ТФУ в воде). Масс-спектры получали на тандемном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов в линейной моде и с использованием рефлектрона. Точность измеренных средних масс в линейной моде составляет 5 Да, точность измеренных моноизотопных масс в рефлекто-моде составляет 0,005%. Идентификацию белков по «пептидному отпечатку» осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com).

2.29. Определение концентрации белка

Определение концентрации белка проводили 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).

2.30. Получение поликлональных антител к рекомбинантным mBFT2-His и prBFT2-His

Иммунизация кроликов препаратами белков mBFT2-His и prBFT2-His и отбор крови осуществлялись в группе экспериментальной биологии с виварием Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН под руководством к.б.н. М. С. Красильщиковой. Для иммунизации использовали:

- препарат очищенного prBFT2-His в 1^x PBS;
- препараты prBFT2-His и mBFT2-His после препаративного электрофореза. Для этого из ПААГ вырезали полосу, соответствующую по массе рекомбинантному белку, помещали в 1^x PBS и гомогенизировали.

100 мкг рекомбинантного белка в объеме 100 мкл 1^x PBS (или суспензии, полученной гомогенизированием полосы геля, содержащей 100 мкг белка) инъецировали кроликам четырехкратно с интервалом в 3-4 недели, после чего через 14 дней отбирали 15 мл крови. Отделяли сыворотку и проверяли изменение титра антител. Также проводили выделение фракции иммуноглобулинов из сыворотки крови с использованием протеин-А сефарозы. Полученные антитела использовали для обнаружения BFT в культуральной жидкости *B. fragilis* (культуральная жидкость была любезно предоставлена Шкопоровым А.Н. (Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия)). Для этого к 1 мл культуральной среды токсигенного и нетоксигенного штаммов *B. fragilis* добавляли ЭДТА до 5 мМ и переосаждали с использованием хлороформ/метанола. Осадок растворяли в 1% SDS и проводили электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях. После этого проводили Вестерн-блот гибридизацию с антителами к prBFT2-His.

2.31. Тест активности BFT на клетках HT-29

Клетки HT-29 (ATCC, номер HTB-38, США) рассевали в 24-луночный планшет в среде DMEM (Invitrogen, США) с 10% FBS (Gibco, США), 2 мМ GlutaMax (Invitrogen, США), 50 мкг/мл гентамицин (Invitrogen, США). На второй день после посева проводили обработку HT-29 рекомбинантными белками, при этом среду заменяли на DMEM (Invitrogen, США) без добавления сыворотки. Концентрация mBFT2-His составляла 0,06, 0,13, 0,25, 0,5, 1 и 2 мкг/мл. Остальные рекомбинантные BFT использовали в концентрациях 1 или 10 мкг/мл. Также с mBFT2-His была проведена

инкубация с клетками HT-29 в присутствии 2 mM PMSF или 5 mM ЭДТА. Активность оценивали по наличию округлившихся клеток с помощью прижизненной съемки с использованием микроскопа Olympus IX51 (Olympus, Япония). Также методом Вестерн-блот гибридизации определяли расщепление E-кадгерина в интактных клетках после обработки рекомбинантными белками. Для этого удаляли среду, клетки лизировали в буфере для нанесения по Лэммли. Лизат обрабатывали ультразвуком, прогревали 10 мин при 95°C и центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин. Супернатант наносили на 10% ПААГ. После этого осуществляли перенос белков на PVDF мембрану и гибридизацию с антителами к E-кадгерину.

2.32. Вестерн-блот гибридизация

После проведения электрофореза проводили полусухой перенос белков на PVDF мембрану (Amersham Biosciences, США) при 1mA на см² геля в течение 2-х часов. Мембрану инкубировали в 1^x PBS с 5% молоком (BioRad, USA) 30 мин и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами, разведенными в 1^x PBS с 5% молоком. В качестве первичных антител использовали IgG мыши к E-кадгерину (LifeTechnologies, США) или IgG кролика к рgBFT2-His в разведении 1:1000. Отмывали мембрану 3 раза по 10 мин 1^x PBS. Инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с вторичными антителами. 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. Отмывали мембрану 3 раза по 10 мин 1^x PBS. Проявляли с использованием набора ECL Plus (Amersham Biosciences, США) согласно инструкции производителя. Сигнал детектировали на пленке Retina XBM (Carestream Health, Inc., США) или системе гель-документирования ChemiDoc MP (Biorad, США). В случае использования пленки для проявки применяли проявитель Д-19 и кислый фиксаж.

2.33. Анализ жизнеспособности клеток HT-29 и индукции апоптоза после обработки mBFT-2 и prBFT-2

Клетки HT-29 рассеивали в 96-луночные планшеты (Greiner Bio-One) в среде DMEM (Invitrogen, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco, США) и 2 mM GlutaMax (Invitrogen, США) и культивировали 48 ч при 37°C и 5% CO₂. Затем среду заменяли на DMEM (Invitrogen, США) без FBS и обрабатывали клетки рекомбинантными белками mBFT-2 и prBFT-2 в концентрациях 0,13, 0,5 и 2 мкг/мл. В качестве контролей использовали среду DMEM без добавок или 50% глицерин в 1^x PBS (буфер для хранения белка) в разведении 1:50 (DMEM+буфер). Анализ жизнеспособности клеток и индукции апоптоза проводили через 1, 12 и 24 часа после добавления белков к клеткам. Использовали коммерческие наборы LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity kit и Click-iT TUNEL AlexaFluor 594 Imaging assay (Life Technologies, США). Выживаемость клеток анализировали согласно инструкции фирмы-производителя. После инкубирования с белками клетки отмывали 3 раза раствором Хэнкса (HBSS) и окрашивали HBSS, содержащим Calcein AM и этидий-гомодимер-1 (оба вещества в концентрации 2,5 мкМ в течение 20 мин при 37°C). После окрашивания клетки немедленно визуализировали на эпифлуоресцентном микроскопе. Делали микрофотографии десяти случайно выбранных полей зрения (20× объектив, линейные размеры поля: 440 мкм × 331 мкм). Живые и мертвые клетки подсчитывали вручную. Группы сравнивали, используя критерий множественных сравнений Тьюки-Крамера. Для выявления индукции апоптоза после инкубирования с белками клетки отмывали 3 раза HBSS и фиксировали 4% параформальдегидом в 1^x PBS 15 мин при комнатной температуре. Click-iT TUNEL Alexa Fluor 594 assay проводили согласно протоколу. Дополнительно 2 лунки с фиксированными клетками обрабатывали ДНКазой I для генерации разрывов в клеточной ДНК. Эти лунки использовались как положительный контроль, клетки в них давали

положительную окраску TUNEL. Окрашенные клетки визуализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа и подсчитывали вручную, без получения микрофотографий.

2.34. Определение протеолитической активности BFT *in vitro*

Для выявления протеолитической активности BFT *in vitro* использовали желатин (Sigma, США), а также хромогенные субстраты азоколл и азоказеин (Sigma, США). К 250 мкл 10% раствора желатина в 1^x PBS, помещенному в пробирку объемом 2 мл, добавляли зрелую и проформы BFT-2 до концентрации 10 мкг/мл и 1^x PBS до конечного объема смеси 300 мкл. В качестве положительного контроля использовали трипсин в той же концентрации. Смесь инкубировали при 37°C в течение 20 часов. Затем пробирки переносили в лед на 10 минут. Протеолитическую активность препарата оценивали по разжижению желатина. Активность рекомбинантного BFT по отношению к азоказеину и азоколлу проверяли согласно рекомендациям производителя данных субстратов. Концентрация рекомбинантных белков составляла 10 мкг/мл, в качестве контроля использовали трипсин (Life Technologies, USA). Перед измерением образцы инкубировали 3-20 ч при 37°C.

Азоказеин растворяли в 1^x PBS, pH 7,5 до концентрации 1мг/мл. После добавления исследуемого образца раствор (300 мкл) инкубировали при 37°C, затем добавляли равный объем 10% трихлорусусной кислоты (ТХУ), после чего все образцы центрифугировали и отбирали 250 мкл супернатанта, к которому добавляли 50 мкл 5М NaOH. Протеолитическую активность исследуемого белка оценивали по развитию окраски, детектируемой при длине волны 440 нм.

К азоколлу добавляли 1^x PBS из расчета 1 мл на 1мг субстрата и растирали в стеклянном гомогенизаторе до образования гомогенной суспензии. В 250мкл суспензии вносили растворы исследуемых белков в концентрации 10мкг/мл и 1^x PBS до конечного объема 300 мкл. После

инкубации образцов при 37 °С и перемешивании, пробы центрифугировали на настольной центрифуге при ускорении 12000 g 10 мин. 250 мкл супернатанта переносили в иммунологический планшет и измеряли оптическую плотность при длине волны 520 нм. Измерения проводили на плащечном фотометре Multiskan Ascent (Thermo electron corporation, США).

Рекомбинантные тиоредоксины (50 мкг/мл), содержащие потенциальные сайты для расщепления для BFT, инкубировали со зрелыми BFT (5 мкг/мл) в течение 24ч при 37 °С. Мутантный белок mBFT2-E349A и трипсин использовали в качестве контроля. Образцы анализировали при помощи SDS-PAGE.

Фракции из клеток линии HT-29, обогащенные E-кадгерином, а также рекомбинантный E-кадгерин (выделенный из *E.coli* и культуры клеток Eхр1 293F) инкубировали с рекомбинантными BFT 1,2,3 (mBFT1-His, mBFT2-His, mBFT3-His) в концентрации 5 мкг/мл в среде DMEM в течение 3 часов при 37°С. Затем пробы анализировали с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (в случае с рекомбинантным E-кадгерином из *E.coli*) или Вестерн-блот гибридизации.

2.35. Исследование способности рекомбинантных rgBFT к автопротеолизу

Рекомбинантные немутантные rgBFT 1, 2, 3, слитые с последовательностью из шести остатков гистидина и без нее, инкубировали в 1^x PBS, рН 7,4 в течение 24 часов при 37°С. Концентрации rgBFT составляла 0,5 мг/мл. Затем пробы анализировали методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях.

2.36. Сбор культуральной среды после обработки клеток линии HT-29 белком mBFT-2

Клетки линии HT-29 выращивали в культуральных флаконах с зоной роста 75 см² в течение 2-х дней в инкубаторе с содержанием CO₂ 5% при

37°C. Использовали среду DMEM (Invitrogen, США), содержащую 10% FBS(Gibco, США) и 2мМ GlutaMax (Invitrogen, США). Затем клетки линии HT-29 промывали три раза HBSS (Gibco, США) и добавляли 10 мл DMEM без FBS в каждый флакон. Затем в два флакона добавляли mBFT-2 до концентрации 1 мкг/мл, а в другие два флакона – равный объем буфера, который использовался для хранения mBFT-2 (0,5^x PBS, 50% глицерин).

По окончании инкубации (1 ч, 37°C, 5% CO₂) среду собирали, добавляли свежеприготовленный PMSF до конечной концентрации 2 мМ и раствор ЭДТА до конечной концентрации 5 мМ. Дебрис осаждали центрифугированием с охлаждением (+4°C) в течение 15 минут при 200g. Супернатант собирали и фильтровали через 0,22 мкм фильтр (Merck Millipore, Германия).

Образец вносили в фильтрующую центрифужную систему Амикон Ультра 15 (Amicon Ultra – 15, Merck Millipore, Германия), содержащую мембрану Ultracel (размер пор позволяет отделять фракцию с молекулярной массой менее 3 кДа) и центрифугировали в бакет-роторе при 4000 g +4°C в течение 1 часа до конечного объема образца 0,5 мл. Перевод образца в аммоний бикарбонатный буфер проводили путем последовательной концентрации образца и разбавления 50 мМ аммоний бикарбонатным буфером (рН 8) с 1 мМ ЭДТА 3 раза подряд. После окончательного концентрирования образца (в аммоний бикарбонатном буфере) до 500 мкл, образец переносили в микроцентрифужную пробирку. Полученный образец замораживали при -130°C и лиофилизировали с использованием Scanvac Coolsafe (Дания).

2.37. Пробоподготовка для проведения LC-MS анализа

Пробоподготовку и LC-MS анализ проводили в лаборатории протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Лيوфилизированные образцы (п. 2.36) ресуспендировали в 100 мМ аммоний бикарбонатном буфере с 0,5% сурфактантом RapiGest SF (Waters, США) или 100 мМ аммоний

бикарбонатном буфере с 10 мМ DTT (BioRad, США). В образцы добавляли 1 мкл смеси ингибиторов протеиназ (GE Healthcare, США), перемешивали и прогревали при 100 °С в течение 5 мин. После охлаждения образца до комнатной температуры нерастворившийся материал удаляли центрифугированием при 15000 g в течение 5 мин. Супернатант отбирали и определяли концентрацию белка по методу Брэдфорд (Bradford Protein Assay Kit, BioRad, США). При использовании RapiGest SF, дисульфидные связи восстанавливали обработкой 10 мМ DTT (BioRad, США) в 100 мМ аммоний бикарбонатном буфере при 60°С в течение 30 мин. Восстановленные дисульфидные группы алкилировали 30 мМ йодацетамидом (BioRad, США) в 100 мМ аммоний бикарбонатном буфере при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. После этого повторно добавляли 10 мМ DTT в 100 мМ аммоний бикарбонатном буфере. Затем образцы обрабатывали трипсином (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, США) в отношении трипсин:белок образца 1:50 при 37°С в течение ночи. Для инактивации трипсина и разрушения сурфактанта (в случае его использования) добавляли ТХУ (Sigma, США) до конечной концентрации 0,5%. Образцы, растворенные в RapiGest SF инкубировали при 37°С в течение 45 мин, а затем центрифугировали при 15000 g в течение 10мин. После этого проводили тандемную хромато-масс спектрометрию.

2.38. LC-MS анализ

Хромато-масс-спектрометрический анализ полученных образцов пептидов проводился с помощью масс-спектрометра TripleTOF 5600+ (ABSciex, Канада), сопряжённого с нано-ВЭЖХ системой NanoLC Ultra 2D+ (Eksigent, США) через источник ионов NanoSpray III (ABSciex, Канада).

Хроматографическое разделение пептидов проводили с помощью хроматографии с использованием предколонки ChromXP (сорбент – C₁₈, длина – 0,5 мм, внутренний диаметр – 350 мкм, размер частиц – 3 мкм, диаметр пор – 120 Å, Eksigent, США) и колонки ChromXP (сорбент – 3C18CL-

120, длина – 15 см, внутренний диаметр – 75 мкм, размер частиц – 3 мкм, диаметр пор – 120 Å, Eksigent, США). Каждую пробу наносили на предколонку в воде для ВЭЖХ с 1% метанола и 0,1% муравьиной кислоты (v/v) со скоростью потока 3,5 мкл/мин в течение 10 минут, после чего предколонку включали в линию перед колонкой. Пептиды элюировали смесью растворителей А (вода для ВЭЖХ с 1% метанола и 0,1% муравьиной кислоты (v/v)) и Б (99.9% ацетонитрила для ВЭЖХ (v/v), и 0,1% муравьиной кислоты (v/v)), линейно повышая содержание растворителя Б от 5% до 40% (v/v) в течение 120 минут (либо с 5% до 27,3% в течение 75 минут и затем до 40% в течение 10 минут) при скорости потока 300 нл/мин, после чего систему промывали пятикратно смесью с 95% (v/v) растворителя Б в течение 7 минут смесью с 95% (v/v) растворителя Б и, после этого, 5 минут смесью с 5% растворителя Б.

Масс-спектрометр работал в режиме данные-зависимого анализа: каждом цикле снимался обзорный масс-спектр и 50 спектров фрагментации наиболее интенсивных в обзорном масс-спектре ионов с интенсивностью выше 250 отсчётов/с и зарядом от +2 до +5. После анализа родительские ионы исключались из рассмотрения на 15 с для получения спектров фрагментации вблизи апекса хроматографического пика (минимальная ширина хроматографических пиков пептидов при таких параметрах ВЭЖХ составляла 30 с). Обзорный масс-спектр снимался в диапазоне отношений массы к заряду от 300 до 1250 m/z со временем накопления в 250 мс. Спектры дочерних ионов снимали в диапазоне отношений массы к заряду от 200 до 1800 m/z со временем накопления в 50 мс. Установленная ширина полосы пропускания селективирующего квадруполя 0,7 Да, ионный пучок фокусировался для достижения наибольшей чувствительности. Для фрагментации, активируемой соударением, использовался азот, энергия столкновений линейно увеличивалась от 25 В до 50 В в течение 50 мс накопления сигнала.

2.39. Анализ изменения количества белка в культуральной среде после обработки клеток линии HT-29 белком mBFT2-His

Данное исследование было выполнено в лаборатории биоинформатики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. После проведения тандемной хромато-масс спектрометрии белки идентифицировали при помощи Mascot search engine v2.2.07 и базы данных UniProt (The UniProt Consortium, ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/complete/, загружена 6 апреля 2012 г., содержит 535248 аминокислотные последовательности). Данные тандемной хромато-масс спектрометрии переводили в Mascot Generic Format, используя AB SCIEX MS Data Converter v1.3. Поиск осуществляли со следующими параметрами: трипсин-специфические пептиды, количество пропущенных сайтов расщепления – один, заряд ионов 1+, 2+, 3+, допуск на расхождение между теоритической и экспериментальной массой пептида – 10 ppm, допуск на расхождение между теоритической и экспериментальной массой фрагмента – 0,5 Да, модификации пептидов – окисление (M) и карбамидометилирование (C), вид - *Homo sapiens*. Данные масс-спектрометрии представлены в ProteomeXchange Consortium (Vizcaino *et al.*, 2014) через PRIDE partner repository (ProteomeXchange accession PXD001271 и PubMed ID: 25998017).

Для анализа изменения количества белков мы рассчитывали их индекс представленности (Exponentially Modified Protein Abundance Index, emPAI) (Ishihama *et al.*, 2005). Статистическая значимость изменений в emPAIs оценивалась по непарному двустороннему Т-критерию Стьюдента. При p-value менее 0,05 изменения считали значимыми. emPAIs нормализовали по среднему значению emPAI для каждого белка. Тепловые карты составляли, используя библиотеку gplots для языка программирования R.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Конструирование плазмид для регулируемой экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих rgBFT 1, 2, 3 и каталитический домен BFT-2

В качестве векторов для регулируемой экспрессии генов в *E. coli* нами были использованы плазмиды pET-15b, pETmin (сконструирована на основе коммерческой плазмиды pET-22b(+), п. 2.15.2) и pBAD/gIII.

В векторе pET экспрессия целевой последовательности находится под контролем сильного промотора поздних генов бактериофага T7 (PT7) (Dubendorff and Studier, 1991, Studier *et al.*, 1990). Клетки штамма-продуцента *E. coli* содержат хромосомную копию гена РНК-полимеразы бактериофага T7 под контролем промотора lacUV5. Регуляция транскрипции осуществляется при помощи репрессора lacI. При добавлении IPTG к культуре таких клеток происходит индукция экспрессии гена РНК-полимеразы бактериофага T7. Эта полимераза обеспечивает экспрессию генов, находящихся в плазмиде pET под контролем PT7. При использовании такой системы экспрессии целевой полипептид может составлять до 50% от всех белков клетки уже через несколько часов после индукции.

Вектор pBAD/gIII предназначен для регулируемой наработки рекомбинантных белков. Благодаря наличию в составе плазмиды участка ДНК, кодирующего сигнальный пептид продукта гена gIII бактериофага fd, возможен транспорт рекомбинантных белков в периплазматическое пространство *E. coli*. Последовательность, кодирующая целевой белок, находится в плазмиде под контролем промотора araBAD *E. coli*. Регуляторный белок, AraC, кодируется той же плазмидой. В присутствии L-арабинозы индуцируется экспрессия генов, находящихся под промотором araBAD, в то время как в отсутствие L-арабинозы уровень экспрессии этих генов крайне низок (Lee *et al.*, 1980, Lee *et al.*, 1987). Варьируя концентрацию индуктора (арабинозы), иногда возможно добиться такого уровня экспрессии

гена, который необходим для получения растворимого белка, секретируемого в периплазматическое пространство *E. coli*. Такая плаزمида со строго регулируемым при помощи белка AgaC промотором может быть использована для получения белков, которые потенциально токсичны для продуцента (*E. coli*).

Для выявления ДНК *B. fragilis* токсигенных штаммов был проведен скрининг 134 образцов ДНК из кала человека. Последовательности ДНК, кодирующие VFT, были обнаружены в 18 образцах. После секвенирования амплифицированных фрагментов было выявлено, что восемь образцов содержат ДНК *B. fragilis*, кодирующую VFT изоформы 1, восемь – изоформы 2, и два образца – изоформы 3. Известно, что в природных условиях токсин *B. fragilis* синтезируется в виде препробелка, состоящего из сигнального пептида и двух доменов (Franco *et al.*, 1997). В процессе созревания сигнальный пептид и N-концевой домен (продомен) отщепляются, а C-концевой (каталитический) домен представляет собой активную форму токсина (mVFT). Исходя из этого, мы амплифицировали последовательности ДНК, кодирующие как только каталитический домен VFT (VFT-CD), так и оба домена (prVFT). Полученные фрагменты ДНК клонировали в плазмидах pET-15b, pETmin или pBAD/GIII, обеспечивающих эффективную экспрессию рекомбинантных генов в *E. coli*. Карты плазмид, полученных в данной работе, представлены на рисунке 13.

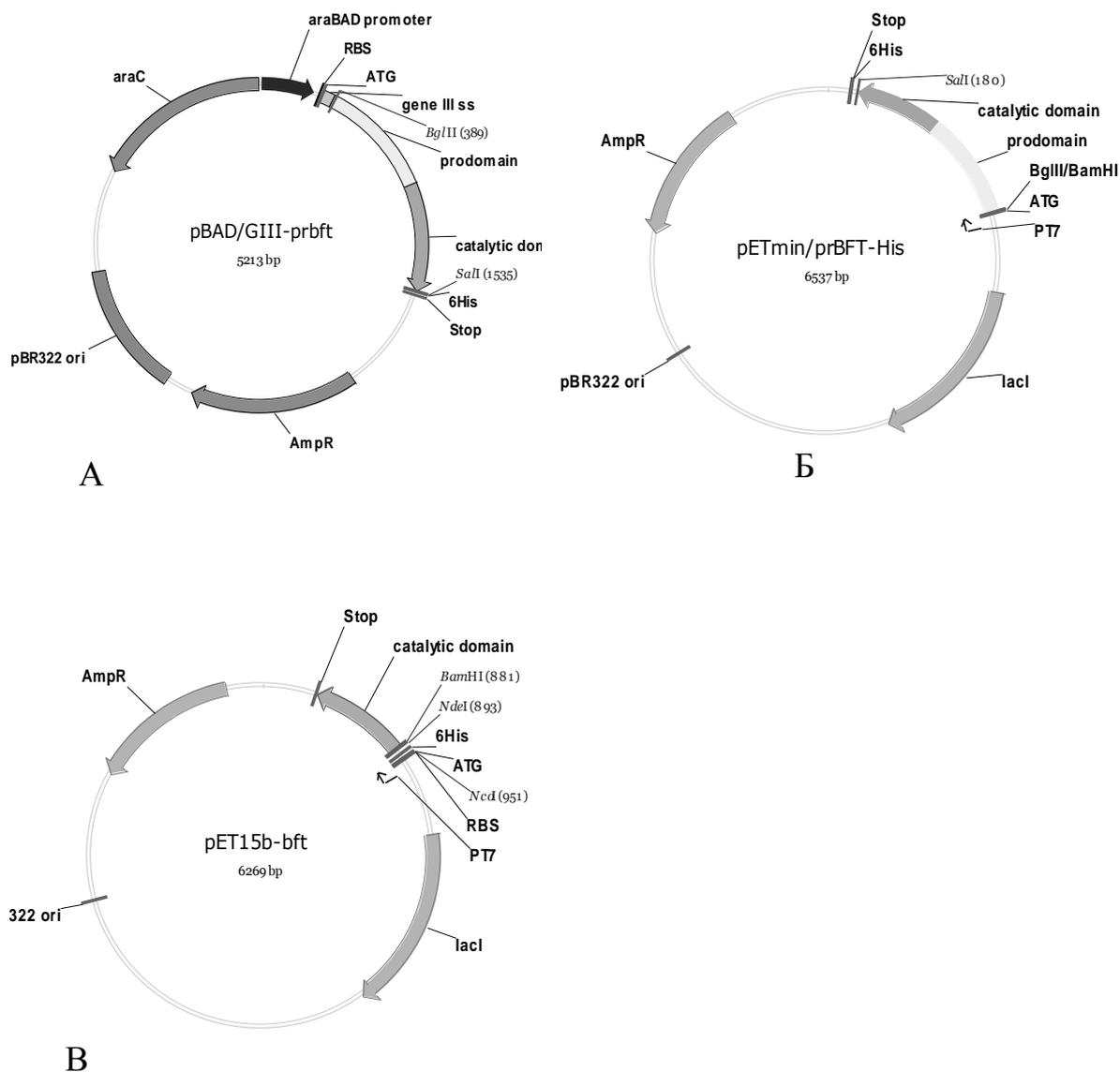


Рисунок 13. Карты плазмид pBAD/GIII-prBFT (A), pETmin/prBFT-His (Б), pET15b-bft (B). araBAD promoter – araBAD промотор *E.coli*; RBS – сайт связывания рибосомы; gene III ss – последовательность, кодирующая сигнальный пептид белка GIII бактериофага fd; prodomain и catalytic domain – последовательности, кодирующие продомен и каталитический домен BFT, соответственно; 6His – область, кодирующая последовательность из шести остатков гистидина; stop – стоп-кодон; AmpR – ген, кодирующий β-лактамазу; pBR322ori – точка начала репликации плазмиды pBR322; araC - ген *araC E. coli*, PT7 - промотор поздних генов бактериофага T7; lacI - ген *lacI E. coli*, ATG – старт-кодон.

Список полученных в данной работе плазмид приведен в таблице 6.

Таблица 6.

Плазмиды, кодирующие BFT, полученные в данной работе.

Название	Кодирующая последовательность	Изоформа	Локализация бHis	Мутации
pET15b-bft	Каталитический домен BFT	2	N-конец	нет
pETmin/prBFT-His	Полноразмерный BFT	2	C-конец	нет
pBAD/GIII-prBFT1	Полноразмерный BFT	1	C-конец	нет
pBAD/GIII-prBFT	Полноразмерный BFT	2	C-конец	нет
pBAD/GIII-prBFT3	Полноразмерный BFT	3	C-конец	нет
pBAD/GIII-prBft1-min	Полноразмерный BFT	1	нет	нет
pBAD/GIII-prBft2-min	Полноразмерный BFT	2	нет	нет
pBAD/GIII-prBft3-min	Полноразмерный BFT	3	нет	нет
pBAD/GIII-prbft1-E349A	Полноразмерный BFT	1	нет	A1046C
pBAD/GIII - prbft2-E349A	Полноразмерный BFT	2	нет	A1046C
pBAD/GIII - prbft3-E349A	Полноразмерный BFT	3	нет	A1046C
pBAD/GIII-prbft2-HY	Полноразмерный BFT	2	нет	C1042T, C1054T, C1072T

В составе BFT имеется цинк-связывающий мотив, характерный для металлопротеиназ клана метцинкина – HEXXHXXGXXH (Moncrief *et al.*,

1995). В этом мотиве остатки гистидина (H348, H352, H358) хелатируют ион цинка, который необходим для катализа, так же как и остаток глутаминовой кислоты (E349). Для исследования, необходима ли нативная структура этого мотива для активности BFT, мы при помощи сайт-направленного мутагенеза ввели в кодирующую его последовательность ДНК мутации. Плазмиды, кодирующие мутантные BFT (с заменами каталитического остатка глутаминовой кислоты на остаток аланина и с заменами остатков гистидина, хелатирующих ион цинка, на остатки тирозина), представлены также в таблице 6.

3.2. Получение векторов для экспрессии гена, кодирующего E-кадгерин, в *E. coli* и клетках линии Expi293F

Поскольку BFT по структуре активного центра гомологичны другим металлопротеиназам и после обработки клеток линии HT-29 белками BFT-1, BFT-2, BFT-3 наблюдается расщепление E-кадгерина, можно предположить, что BFT – протеиназа, субстратом которой является E-кадгерин. Для проверки этого предположения необходимо было получить рекомбинантный полноразмерный E-кадгерин. Нами были сконструированы плазмиды для экспрессии кодирующей его последовательности ДНК как в бактериях (*E. coli*), так и клетках человека (линия Expi293F). Список плазмид приведен в таблице 7.

Таблица 7.

Плазмиды, кодирующие E-кадгерин, полученные в данной работе.

Название	Кодирующая последовательность	Локализация 6His	Система экспрессии
pCad-min	полноразмерный E-кадгерин без сигнального пептида	C-конец	<i>E. coli</i>
pсDNA3.4-cad	полноразмерный E-кадгерин с сигнальным пептидом	C-конец	Expi293F

Карты плазмид pCad-min и pcDNA3.4-cad представлены на рисунке 14.

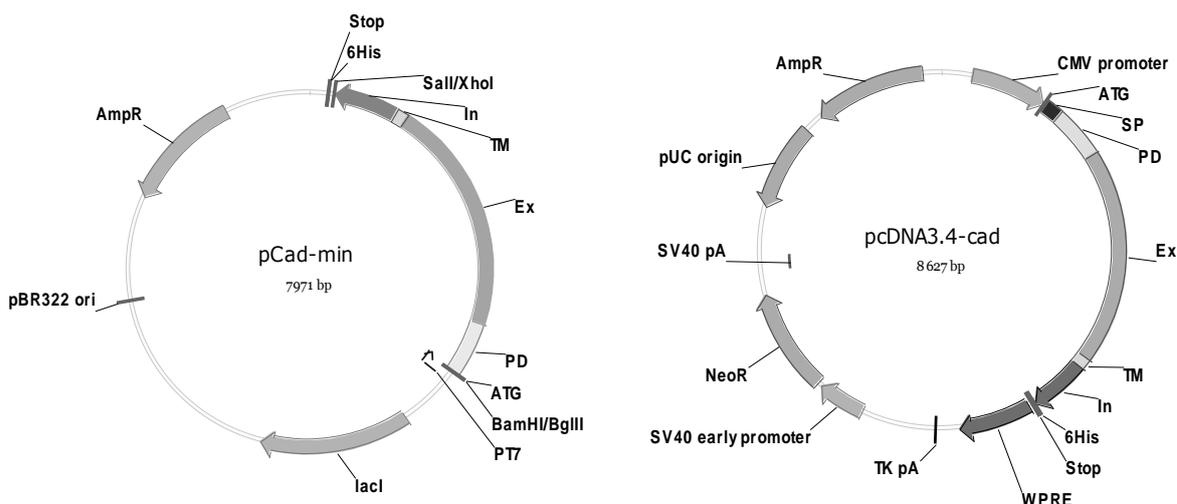


Рисунок 14. Карты плазмид pCad-min и pcDNA3.4-cad. AmpR – ген устойчивости к ампициллину; pBR322 ori и pUC ori – точки начала репликации в бактериях; lacI – ген *lacI* *E. coli*; PT7 – промотор поздних генов бактериофага T7; CMV promoter – промотор цитомегаловируса человека; AmpR – ген устойчивости к ампициллину; NeoR – ген устойчивости к неомицину, SV40 pA – сигнал полиаденилирования; SV40 early promoter – промотор вируса SV40, TK pA – сигнал полиаденилирования гена тимидинкиназы вируса простого герпеса; WPRE – посттранскрипционный регуляторный элемент; сокращениями обозначены последовательности, кодирующие: SP – сигнальный пептид; PD – продомен E-кадгерина; Ex – внеклеточный фрагмент E-кадгерина; TM – трансмембранный фрагмент E-кадгерина; In – внутриклеточный фрагмент E-кадгерина; 6His – последовательность из шести остатков гистидина.

Далее полученные плазмиды были использованы нами для наработки E-кадгерина в клетках *E. coli* и Expi293F.

3.3. Получение рекомбинантных BFT

Полученные векторы (п. 3.1.) были использованы для наработки рекомбинантных BFT в *E. coli*. Для выявления локализации целевых белков клетки штамма-продуцента разрушали и фракционировали, полученные фракции анализировали методом SDS-PAGE (рисунки 15 и 16). В таблице 8 представлена локализация рекомбинантных белков в разных фракциях клеток штаммов-продуцентов.

Локализация рекомбинантных ВФТ в клетках *E. coli*

Рекомбинантная плаزمида	Штамм-производитель	Локализация рекомбинантного белка в растворимой фракции <i>E. coli</i>	Локализация рекомбинантного белка в тельцах включения
pET15b-bft	B834(DE3)	-	+
pETmin/prBFT-His	BL21(DE3) gold	+	+
pBAD/GIII-prBFT1	Top 10	-	+
pBAD/GIII-prBFT	Top 10	-	+
pBAD/GIII-prBFT3	Top 10	-	+
pBAD/GIII-prBft1-min	Top 10	-	+
pBAD/GIII-prBft2-min	Top 10	-	+
pBAD/GIII-prBft3-min	Top 10	-	+
pBAD/GIII-prbft1-E349A	Top 10	-	+
pBAD/GIII-prbft2-E349A	Top 10	-	+
pBAD/GIII-prbft3-E349A	Top 10	-	+
pBAD/GIII-prbft2-HY	Top 10	-	+

Таким образом, во всех случаях было выявлено накопление рекомбинантных полипептидов с ожидаемой электрофоретической подвижностью (20 кДа для рекомбинантного каталитического домена ВФТ изоформы 2 (ВФТ2-CD) и около 42 кДа для про-форм ВФТ (prBFT)) в нерастворимой фракции клеток штамма-производителя, наиболее вероятно – в тельцах включения (рисунки 15 и 16). Накопление целевого белка в растворимой форме было обнаружено только в одном случае – в штамме-производителе BL21(DE3) gold/ pETmin/prBFT-His.

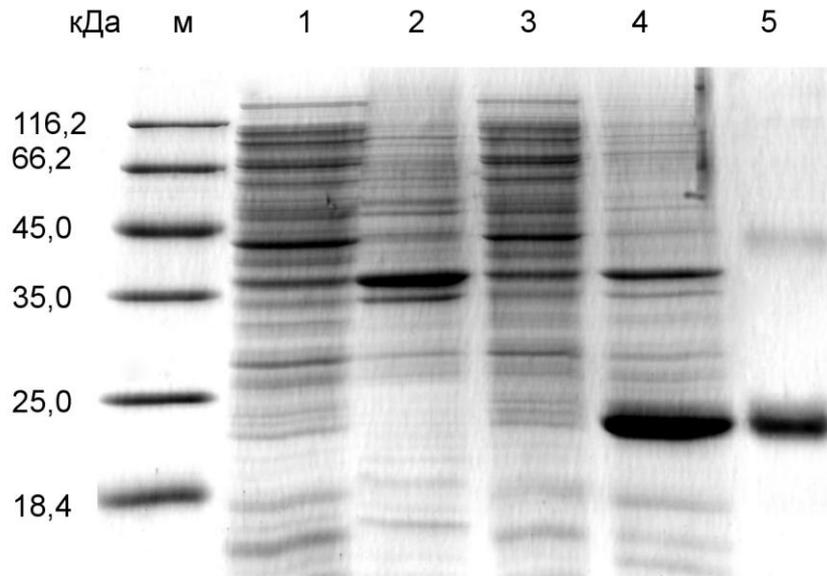


Рисунок 15. Электрофореграмма SDS-PAGE (15% АА) различных фракций клеток *E.coli* B834(DE3)/pET15-bft и очищенного рекомбинантного каталитического домена ВFT-2. 1 – растворимая фракция культуры до индукции; 2 – нерастворимая фракция культуры до индукции; 3 – растворимая фракция культуры через 4 часа после индукции; 4 – нерастворимая фракция культуры через 4 часа после индукции; 5 – очищенный препарат белка после металло-хелатной аффинной хроматографии. В качестве индуктора использовали 0,5 мМ IPTG. Окраска геля Кумасси G-250.

Электрофоретический анализ препаратов целевых белков, полученных в результате проведения металло-хелатной аффинной хроматографии, показал, что в случае препарата рекомбинантного каталитического домена ВFT изоформы 2 (ВFT2-CD) наблюдается индивидуальная полоса на уровне 20 кДа (рисунок 15), в то время как в образце выделенной про-формы ВFT (rgVFT) наблюдается три полосы – 42 кДа (ожидаемый), 35 кДа и 30 кДа (на рисунке 18, дорожка 1 приведены данные для rgVFT2-His, для остальных изоформ ВFT наблюдалась та же картина). После хроматографии рекомбинантные белки подвергли диализу против 1^x PBS. При этом целевые белки оставались в растворимой форме.

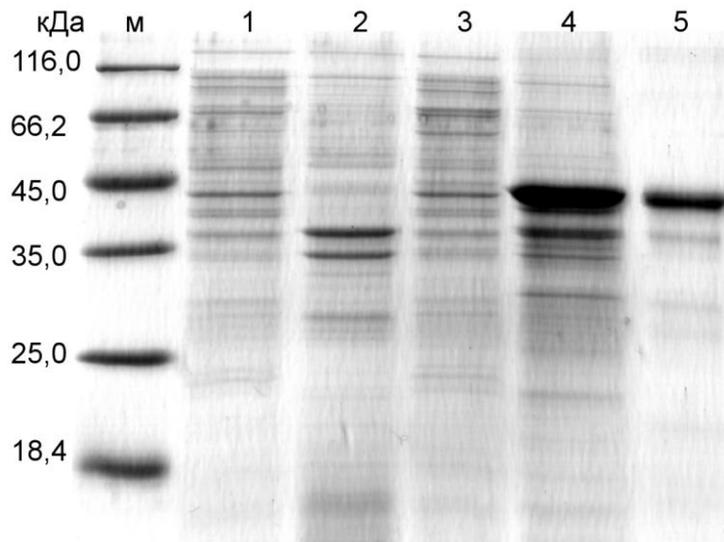
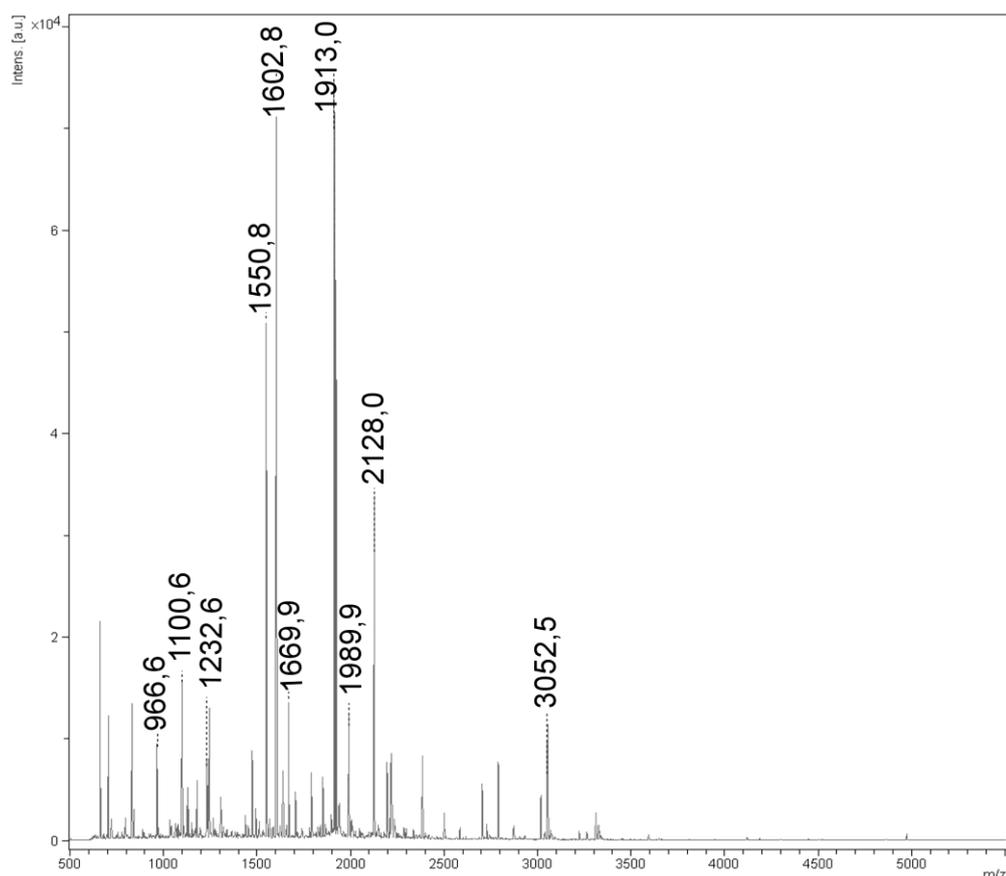


Рисунок 16. Электрофореграмма SDS-PAGE (12% АА) различных фракций клеток *E.coli* Top10/pBADGIII-prbft и очищенного рекомбинантного prBFT2-His. 1 – растворимая фракция культуры до индукции; 2- нерастворимая фракция до индукции; 3 – растворимая фракция культуры через 4 часа после индукции; 4 – нерастворимая фракция через 4 часа после индукции; 5 – очищенный препарат белка после металло-хелатной аффинной хроматографии. В качестве индуктора использовали 0,2% арабинозу. Окраска геля Кумасси G-250.

Анализ MALDI-масс-спектров подтвердил аутентичность полученных BFT (рисунок 17). При этом установлено, что полосы в образце очищенного prBFT с молекулярными массами 35 кДа и 30 кДа также соответствуют BFT.



1 MKNVLLLLML GTAALLAACS NEADSLTTSI DTPVTASIDL QSVSYTDLAT
 51 QLNDVSDFGK MIILKDNGFN RQVHVSMDDR TKIQLDNENV RLFNGRDKDS
 101 **TSFILGDEFA** **VLR**FYRNGES **ISYIAYKEAQ** **MMNEIAEFYA** **APFK**KTRAIN
 151 EK**EAFECIYD** **SR**TRSAGKDL VSVKINIDKA KKILNLPECD YINDYIK**TPQ**
 201 **VPHGITESQT** **RAVPSEPKTV** **YVICLRESGS** **TVYPNEVSAQ** **MQDAANSVYA**
 251 **VHGLKR**FVNLFVNL HFVLYTTEYS CPSGNADEGL DGFTASLKAN PK**AEGYDDQI**
 301 **YFLIRWGTWD** **NNILGISWLD** **SYNVNTASDF** **KASGMSTTQL** MYPGVMANHEL
 351 GHILGARHAD DPKDLMYSKY **TGYLFLHSEE** **NMYR**IAKNLIG WEIADGD

Рисунок 17. Масс-спектр в диапазоне 0,5 – 5 кДа очищенного препарата prBFT2-Nis после трипсинолиза в геле. Идентификацию белков по «пептидному фингерпринту» осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводился в базе данных NCBI среди белков *B. fragilis* и однозначно и достоверно (score =184) выявил металлопротеиназу *B. fragilis* (BFT-2) [GI:4757387] «Перекрывание» последовательности, согласно присутствующим на масс-спектре сигналам пептидов, составило 42%. Под масс-спектром приведена аминокислотная последовательность полноразмерного BFT-2 *B. fragilis* (сигнальный пептид, продомен и каталитический домен), красным выделены пептиды, идентифицированные масс-спектрометрией.

3.4. Получение зрелых VFT из рекомбинантных пробелков

Далее необходимо было провести конверсию rgVFT в зрелую форму. Это осуществляли путем обработки выделенного rgVFT трипсином, как описано в п. 2.20. При высоких концентрациях трипсина или длительном инкубировании наблюдалось полное расщепление rgVFT (рисунок 18, дорожка 4). При оптимальном соотношении времени инкубации и концентрации трипсина в продуктах гидролиза при электрофоретическом анализе по Лэммли наблюдалась мажорная полоса, по массе соответствующая природному VFT (20 кДа) (рисунок 18, дорожка 3). В случае более низких концентраций трипсина происходил частичный гидролиз с образованием ряда промежуточных форм (рисунок 18, дорожка 2). На рисунке 18 приведены данные электрофоретического анализа продуктов трипсинолиза rgVFT2-His (для остальных изоформ процесс ограниченного трипсинолиза проходил аналогично).

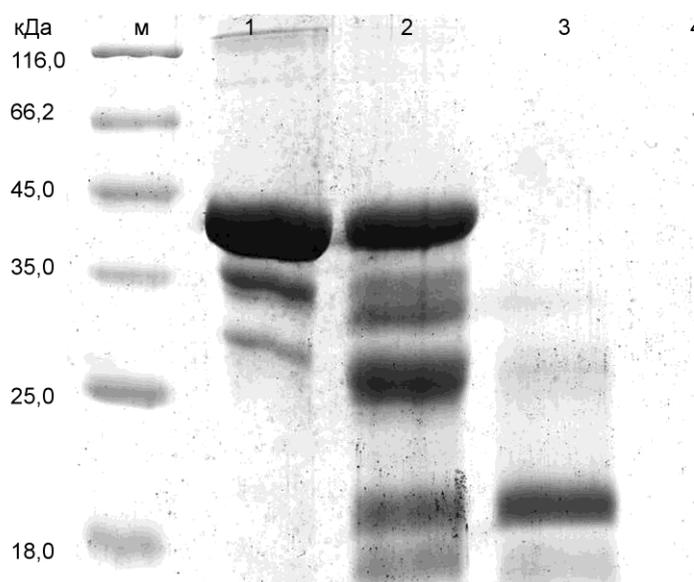


Рисунок 18. Электрофореграмма разделения в полиакриламидном геле по Лэммли продуктов ограниченного трипсинолиза rgVFT2-His в течение 1 ч при 37°C. 1 – исходный образец рекомбинантного rgVFT-2; 2, 3, 4 – rgVFT2-His после инкубации с 1, 10, 100 мкг/мл трипсина, соответственно. Для остальных изоформ процесс ограниченного трипсинолиза проходил аналогично. Окраска геля Кумасси G-250.

При помощи секвенирования по Эдману показано, что N-концевая последовательность белка, составляющего мажорную фракцию после проведения ограниченного трипсинолиза prBFT2-His, соответствует N-концевой последовательности (AVPSEP) каталитического домена зрелого BFT-2, секретируемого *B. fragilis* (Franco *et al.*, 1997), что свидетельствует о корректном процессинге пробелка *in vitro*.

Таким образом, после процессинга пробелков (prBFT) путем ограниченного трипсинолиза были получены зрелые белки (mBFT) с ожидаемой электрофоретической подвижностью, соответствующей молекулярной массе белка около 20 кДа. На рисунке 19 приведены схематичные изображения рекомбинантных BFT, полученных в гетерологичной системе *E. coli* в нашей работе.

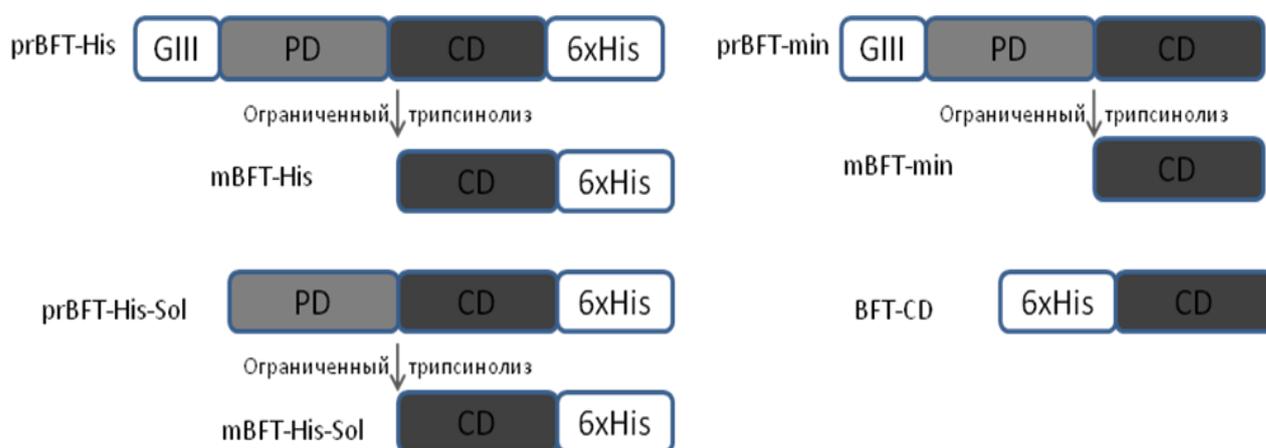


Рисунок 19. Схемы рекомбинантных BFT, полученных в гетерологичной системе *E. coli* в нашей работе. GIII – сигнальный пептид белка GIII бактериофага fd; PD и CD – продомен и каталитический домен BFT, соответственно; 6xHis – последовательность из шести остатков гистидина.

Список полученных в данной работе рекомбинантных зрелых BFT приведен в таблице 9.

Рекомбинантные BFT, полученные в данной работе.

№	Название	Изоформа	Описание	6xHis	Расщепление E-кадгерина (клетки HT-29)
1.	BFT2-CD	2	Каталитический домен BFT, получен из телец включения <i>E. coli</i>	+	-
2.	mBFT1-His	1	Зрелый BFT, получен из prBFT, ренатурированного из телец включения <i>E. coli</i>	+	+
3.	mBFT2-His	2	Аналогично №2	+	+(рисунки 25, 26)
4.	mBFT3-His	3	Аналогично №2	+	+
5.	mBFT1-min	1	Аналогично №2	-	+(рисунок 30)
6.	mBFT2-min	2	Аналогично №2	-	+(рисунок 30)
7.	mBFT3-min	3	Аналогично №2	-	+(рисунок 30)
8.	mBFT2-His-Sol	2	Зрелый BFT, получен из prBFT, накапливающегося в растворимой фракции <i>E. coli</i>	+	+

В процессе работы мы модифицировали процесс выделения рекомбинантных BFT, слитых с последовательностью из шести остатков гистидина. Нами было отмечено, что пробелок, а также зрелый BFT не полностью элюируются 20 mM Na⁺-фосфатный буфером, содержащим 0,5 M NaCl и 500 mM имидазола. Применение для элюции буфера с ЭДТА позволило полностью освободить сорбент от связавшегося белка.

При работе с BFT, не содержащими гексагистидиновую последовательность, мы исключили из процедуры выделения стадию метал-хелатной аффинной хроматографии растворенных в мочеvine телец включения. Тельца включения рефолдировали путем диализа и проводили ограниченный трипсинолиз препарата. Последующая метал-хелатная аффинная хроматография позволяла выделить зрелый целевой белок. Таким образом, в процессе получения рекомбинантных белков без C-концевой

последовательности из шести остатков гистидина было выявлено, что зрелые изоформы VFT сохраняют способность связываться с Ni-сефарозой. В дальнейшем такая способность была показана и для про-форм VFT, в том числе и для мутантных белков (рисунок 20).

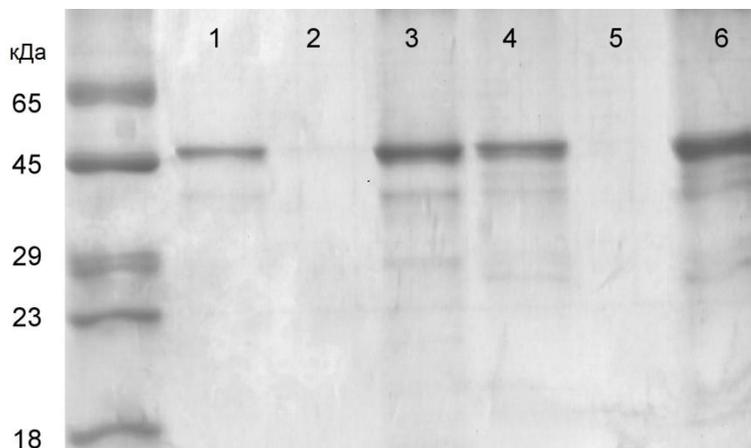


Рисунок 20. Электрофореграмма разделения в полиакриламидном геле по Лэмбли хроматографических фракций rVFT 1 и 2 без полигистидиновых последовательностей. rVFT-1: 1 – фракция элюата; 2 – несвязавшаяся с Ni-сефарозой фракция; 3 – растворённые тельца включения, содержащие rVFT-1, до очистки; rVFT-2: 4 – фракция элюата; 5 – несвязавшаяся с Ni-сефарозой фракция; 6 – растворённые тельца включения, содержащие rVFT-2, до очистки. Окраска геля Кумасси G-250.

Если предположить, что связывание происходит через цинк-связывающий мотив белка, то в этом случае проблематично объяснить связывание про-формы – согласно данным рентгеноструктурного анализа (Goulas *et al.*, 2011), участок белка, содержащий данный мотив, экранирован продоменом. Мы провели замену остатков гистидина, хелатирующих ион цинка, на остатки тирозина и показали, что такой мутантный белок сохраняет способность связываться с Ni-сефарозой. Таким образом, мы исключили участие цинк-связывающего мотива VFT в связывании с сорбентом.

3.5. Выделение рекомбинантных E-кадгеринов

Для получения белка, который является возможным субстратом для VFT, плазмидой pCad-min трансформировали клетки *E. coli* штамма B834

(DE3). Анализ фракций клеток штамма-продуцента выявил накопление рекомбинантного E-кадгерина в тельцах включения. Вследствие этого, очистку белка путем метал-хелатной хроматографии проводили в денатурирующих условиях, после чего белок рефолдировали путем диализа образцов против 20 mM Tris, pH 8,0. При этом рекомбинантный E-кадгерин оставался растворимым.

Плазмидой pcDNA3.4-cad трансфицировали клетки человека линии Ecrі293F. Клетки, продуцирующие рекомбинантный E-кадгерин, растворяли в буфере, содержащем 8 M мочевины. Далее проводили очистку рекомбинантного E-кадгерина при помощи метал-хелатной хроматографии. Поскольку выделение проводили в денатурирующих условиях, очищенный E-кадгерин диализовали против 1^x PBS, pH 7,4.

Рекомбинантные E-кадгерины, выделенные из клеток *E. coli* и клеток линии Ecrі293F, использовали для определения активности BFT.

3.6. Гель-фильтрация препаратов BFT

Для выявления олигомерного статуса BFT мы использовали гель-фильтрацию. В зависимости от своей молекулярной массы белки разное время удерживаются на колонке, при этом в первую очередь с колонки выходят белки с высокой молекулярной массой. Superdex 200 позволяет разделить белки с диапазоном молекулярных от 10 до 600 кДа. Соединения, масса которых превышает 600 кДа, не удерживаются колонкой. Исследуемые нами белки (как про-, так и зрелые BFT) не задерживаются Superdex200 и выходят с колонки в том же объеме, что и голубой декстран (молекулярная масса более 2 МДа). Таким образом, все три изоформы (как про-, так и зрелые BFT) образуют комплекс с молекулярной массой не менее нескольких сотен кДа (рисунки 21, 22).

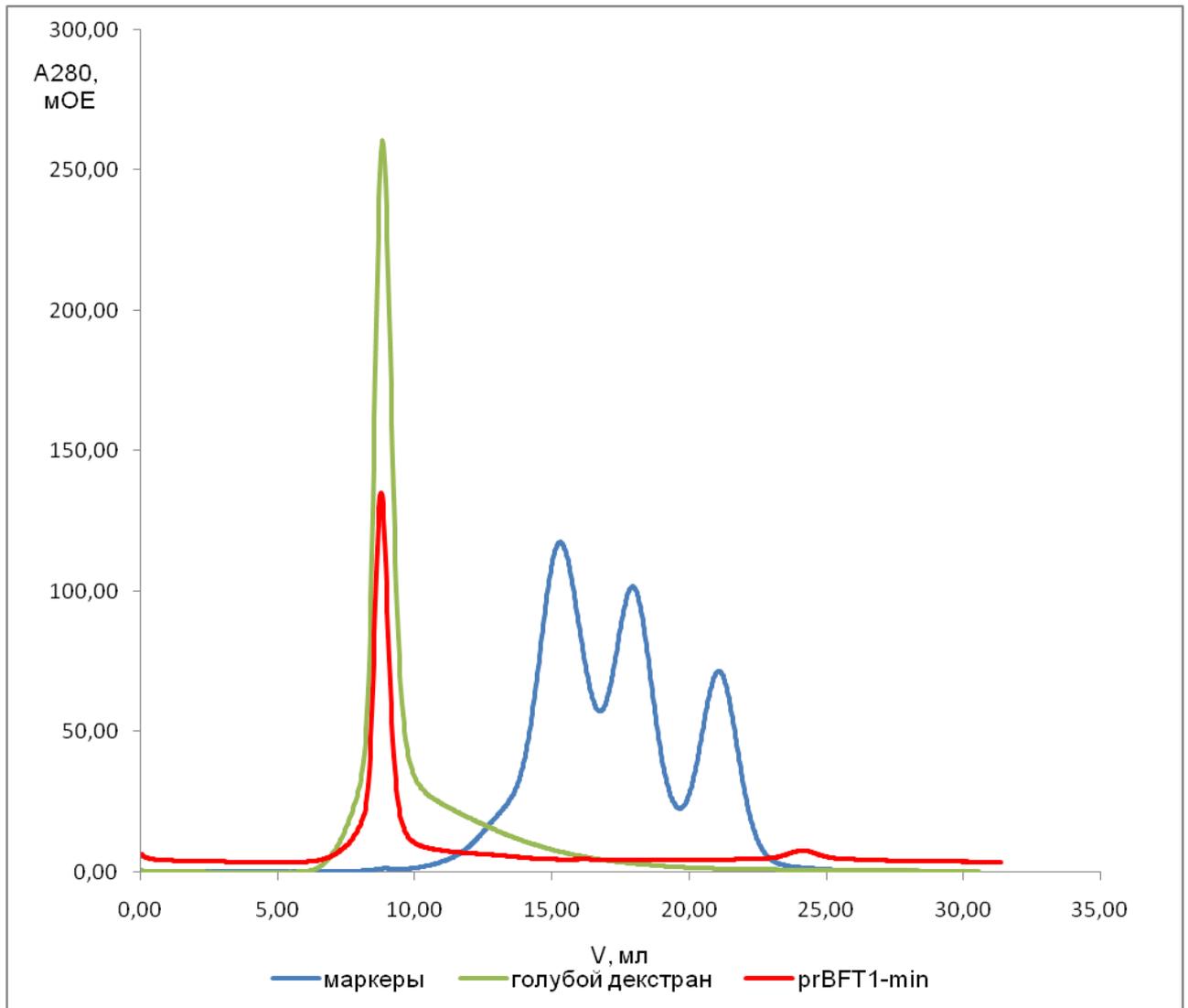


Рисунок 21. Профиль гель-фильтрации prBFT1. Рекомбинантный prBFT 1 образует комплекс с молекулярной массой не менее нескольких сотен кДа. Superdex 200, набор маркеров Gel Filtration Calibration Kit LMW (GE Healthcare, США) – апротинин (6,5 кДа), карбоангидраза (29 кДа), кональбумин (75 кДа).

Кроме того, при сравнении профилей гель-фильтрации mBFT2-His и mBFT2-His-Sol видно, что эти два белка выходят с колонки в одном и том же объеме.

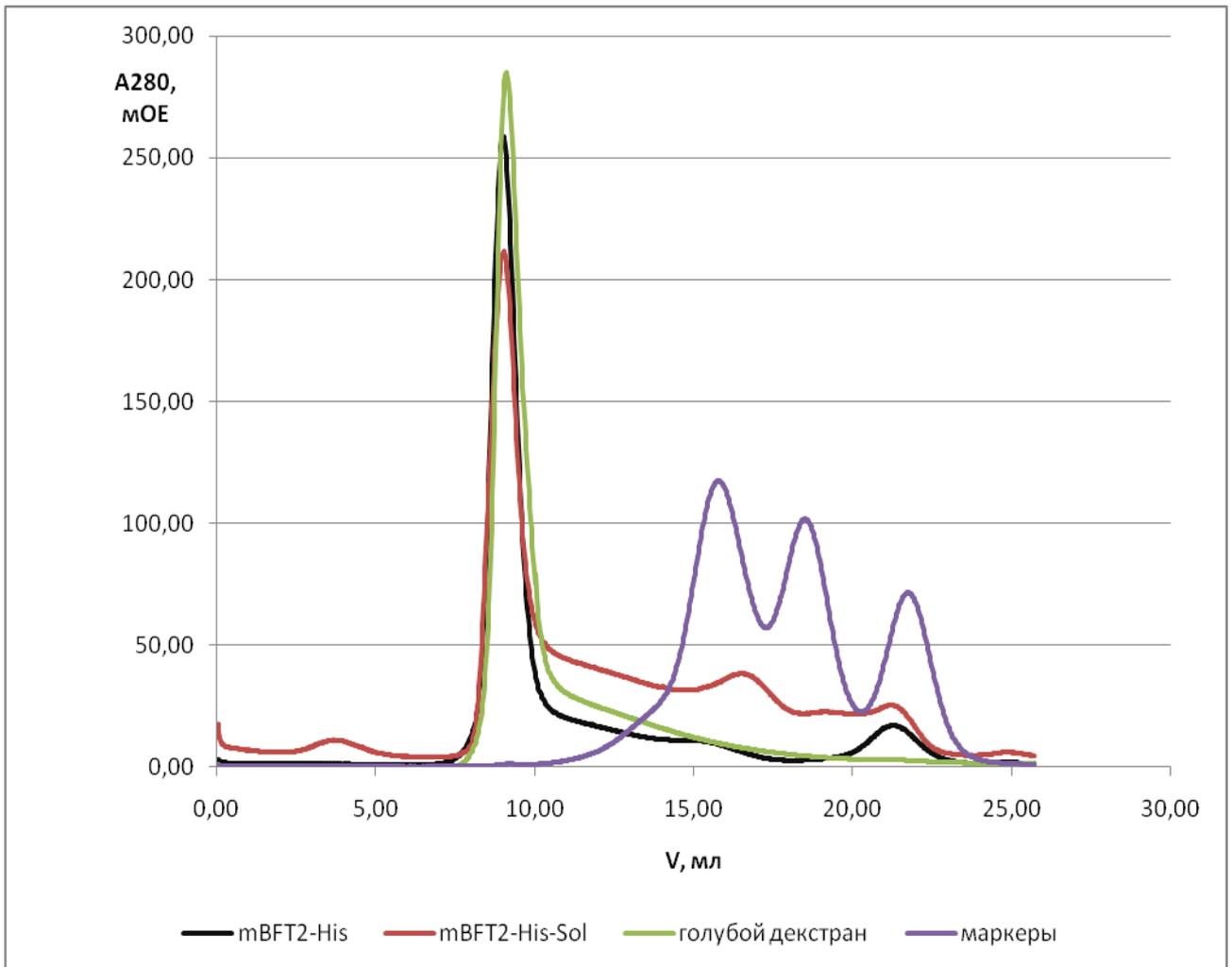


Рисунок 22. Профили гель-фильтрации mBFT2-His и mBFT2-His-Sol. Superdex 200, набор маркеров Gel Filtration Calibration Kit LMW (GE Healthcare, США) – апротинин (6,5 кДа), карбоангидраза (29 кДа), кональбумин (75 кДа).

Таким образом, зрелые BFT-2, полученные из пробелка, как ренатурированного из телец включения *E. coli*, так и накапливающегося в растворимой форме, демонстрируют одинаковую способность формировать высокомолекулярные комплексы.

3.7. Определение нуклеотидной последовательности генома энтеротоксигенного изолята *B. fragilis*

До настоящего времени в GenBank не было представлено полных последовательностей геномов энтеротоксигенных штаммов *B. fragilis*. В рамках данной работы впервые была определена полная нуклеотидная

последовательность генома *B. fragilis* изолята BOB25. Суммарно получено 685605 прочтений с 29-кратным покрытием генома. Первичная сборка с использованием программы Newbler version 2.9 дала 42 контига размером более 1000 п.н. каждый. Нуклеотидная последовательность недостающих участков между контигами была определена путем секвенирования соответствующих ампликонов. Полный геном *B. fragilis* изолята BOB25 состоит из 5 282 232 п.н., содержание GC составляет 43,2%. Аннотация была осуществлена с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok). Идентифицировано 4 112 кодирующих последовательностей, 18 генов рРНК, 70 генов тРНК. Выявлен островок патогенности (VfPAI), находящийся внутри транспозона СТn86. При этом данный транспозон представлен в геноме *B. fragilis* изолята BOB25 дважды. Островок патогенности содержит гены, кодирующие металлопротеиназы BFT-2 и MPII.

Последовательность генома *B. fragilis* изолята BOB25 опубликована в GenBank под номером CP011073.

3.8. Получение антител к BFT-2

К настоящему времени неизвестно, где происходит процессинг prBFT – в цитоплазме *B. fragilis* или же во внешней среде при помощи протеиназ желудочно-кишечного тракта, например, трипсина (как это было предположено Goulas T. с коллегами (Goulas *et al.*, 2011)). Для того, чтобы выявить, присутствует ли prBFT в культуральной жидкости *B. fragilis*, необходимо было получить антитела к этому белку.

С целью получения антител к BFT-2 мы четырежды иммунизировали кроликов с интервалом в 3-4 недели следующими препаратами:

- prBFT2-His – препарат после метал-хелатной аффинной хроматографии, переведенный в 1^x PBS;
- prBFT2-His после препаративного гель-электрофореза;
- mBFT2-His после препаративного гель-электрофореза.

Из сыворотки крови выделяли фракцию иммуноглобулинов с использованием протеин-А сефарозы. Полученные поликлональные антитела тестировали методом вестерн-блот гибридизации против исходного иммуногена. На рисунке 23 приведены данные по детекции иммуногена prBFT2-His полученными антителами (все первичные антитела использовались в разведении 1:1000).

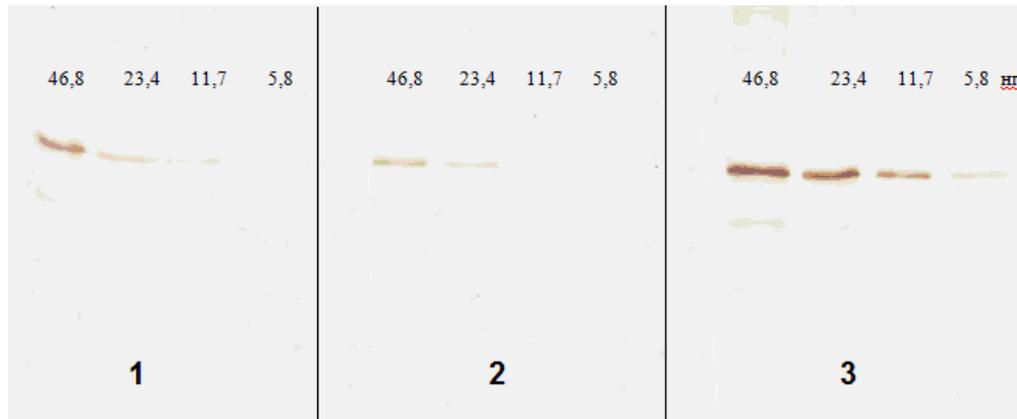


Рисунок 23. Вестерн-блот гибридизация prBFT2-His со специфическими антителами, полученными в данной работе. Детектировали prBFT2-His антителами, полученными с использованием в качестве иммуногена: 1 – mBFT2-His (после препаративного гель-электрофореза); 2 – prBFT2-His (после препаративного гель-электрофореза); 3 – prBFT2-His (препарат после метал-хелатной хроматографии, переведенный в 1^x PBS). Цифрами вверху дорожек указано количество внесенного prBFT2-His в нг.

По результатам вестерн-блот гибридизации наименьшее количество иммуногена удалось выявить в случае использования антител, полученных с использованием для иммунизации нативного prBFT2-His. Эти антитела использовали для обнаружения BFT-2 в культуральной жидкости энтеротоксигенного штамма *B. fragilis* (рисунок 24).

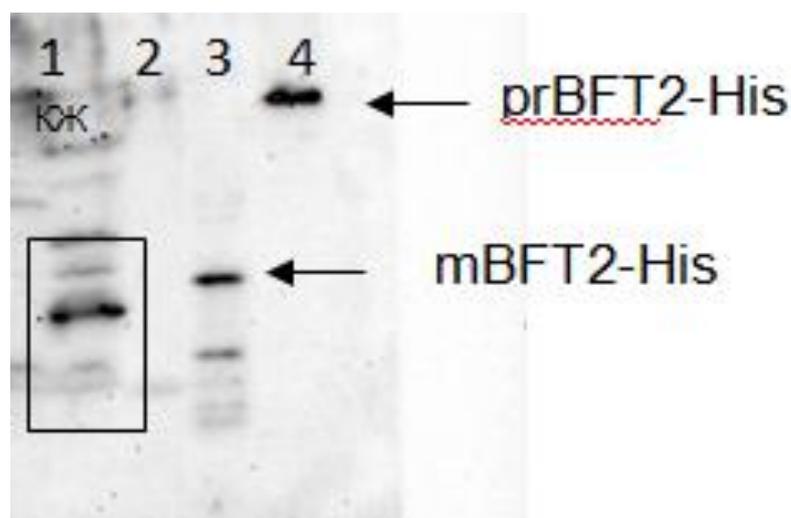


Рисунок 24. Вестерн-блот гибридизация с антителами к prBFT2-His. 1 – белки, осажденные из 1 мл культуральной жидкости (КЖ) энтеротоксигенного штамма *B. fragilis*; 2 – белки, осажденные из 1 мл культуральной жидкости неэнтеротоксигенного штамма *B. fragilis*; 3 – рекомбинантный mBFT2-His, 5 нг; 4 – рекомбинантный prBFT2-His, 5 нг.

При этом для выявления BFT-2 нам потребовалось осадить белки из 1 мл культуральной жидкости. В культуральной жидкости энтеротоксигенного штамма *B. fragilis* был обнаружен только зрелый BFT-2.

3.9. Действие выделенных BFT на линию клеток HT-29

На следующем этапе мы оценивали активность рекомбинантных BFT, используя метод, разработанный в 1992 г. Weikel C.S. (Weikel *et al.*, 1992), а именно по изменению морфологии клеток линии аденокарциномы толстого кишечника человека HT-29 (округлению), а также по расщеплению E-кадгерина клеток данной линии (Wu *et al.*, 1998) после обработки BFT. Мы выявили, что зрелые немутантные BFT (mBFT, все изоформы, как слитые с последовательностью из шести остатков гистидина, так и без нее), вызывают округление клеток HT-29 (рисунок 25).

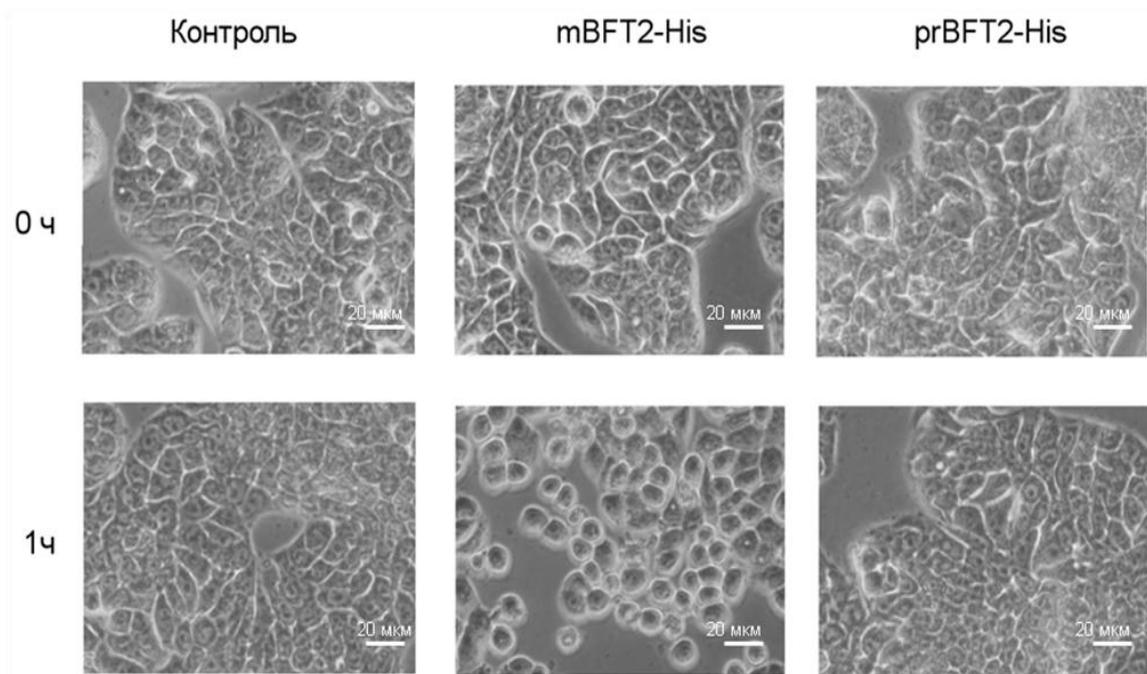


Рисунок 25. Изменение морфологии клеток линии HT-29 после обработки mBFT2-His (2 мкг/мл) и prBFT2-His (5 мкг/мл). В контрольные образцы был добавлен 1^x PBS. Снимки получены с использованием Olympus Live Cell Imaging System (Olympus, Япония). Изменения морфологии клеток HT-29 после обработки mBFT1-His, mBFT3-His, mBFT1-min, mBFT2-min, mBFT3-min и mBFT2-His-Sol были такими же, как для mBFT2-His.

Однако, воздействие на те же клетки про-формы BFT (prBFT, состоит из продомена и каталитического домена) (рисунок 25) или рекомбинантного каталитического домена BFT (BFT2-CD) не приводит ни к каким значимым изменениям в морфологии. Методом Вестерн-блот гибридизации с антителами к E-кадгерину показано, что обработка клеток HT-29 mBFT приводит к полному расщеплению E-кадгерина, в то время как при инкубации с prBFT (рисунок 26) или BFT2-CD расщепления E-кадгерина не наблюдается. Результаты суммированы в таблице 9.

На основании этих данных мы предположили, что полученный BFT2-CD в процессе ренатурации не принимает нативную конформацию. Показано также, что добавление PMSF (ингибитора сериновых протеиназ) не препятствовало расщеплению E-кадгерина, в то время как 5 мМ EDTA (ингибитор металлопротеиназ, хелатирует двухвалентные катионы) ингибирует этот процесс (рисунок 26). Поскольку BFT имеет в составе цинк-

связывающий мотив, характерный для металлопротеиназ клана метцинкина, эти данные согласуются с представлением о том, что E-кадгерин может являться субстратом для BFT.

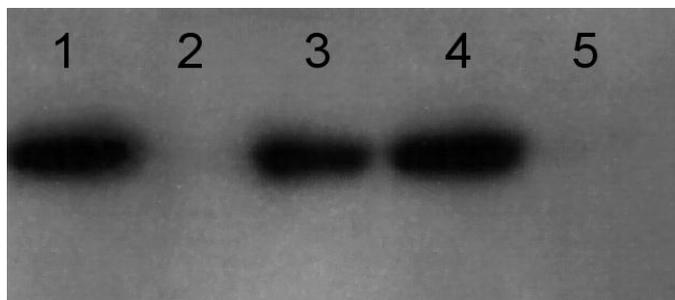


Рисунок 26. Вестерн-блот гибридизация с антителами к E-кадгерину лизатов клеток HT-29 после инкубации с рекомбинантными BFT-2. Лизат культуры клеток HT-29 после обработки в течение 1 ч: 1 – контроль, 1^x PBS; 2 – mBFT2-His (10 мкг/мл); 3 – prBFT2-His (20 мкг/мл); 4 – mBFT2-His (10 мкг/мл), в присутствии ЭДТА (5 мМ); 5 – mBFT2-His (10 мкг/мл), в присутствии PMSF (5 мМ). Молекулярная масса E-кадгерина – 120 кДа.

Также мы исследовали влияние обработки BFT клеток HT-29 на их жизнеспособность. При оценке жизнеспособности клеток линии HT-29 не было выявлено статистически значимых различий между клетками, обработанными различными концентрациями mBFT2-His и prBFT2-His и контрольными клетками, обработанными только DMEM или же DMEM с добавлением буфера, который использовался для хранения рекомбинантных белков (рисунок 27). Статистически значимое снижение жизнеспособности было выявлено только для клеток, обработанных средой DMEM с добавлением буфера в течение 1 часа, при сравнении их с другими образцами. Однако эти различия невелики и могут быть вызваны случайными причинами.

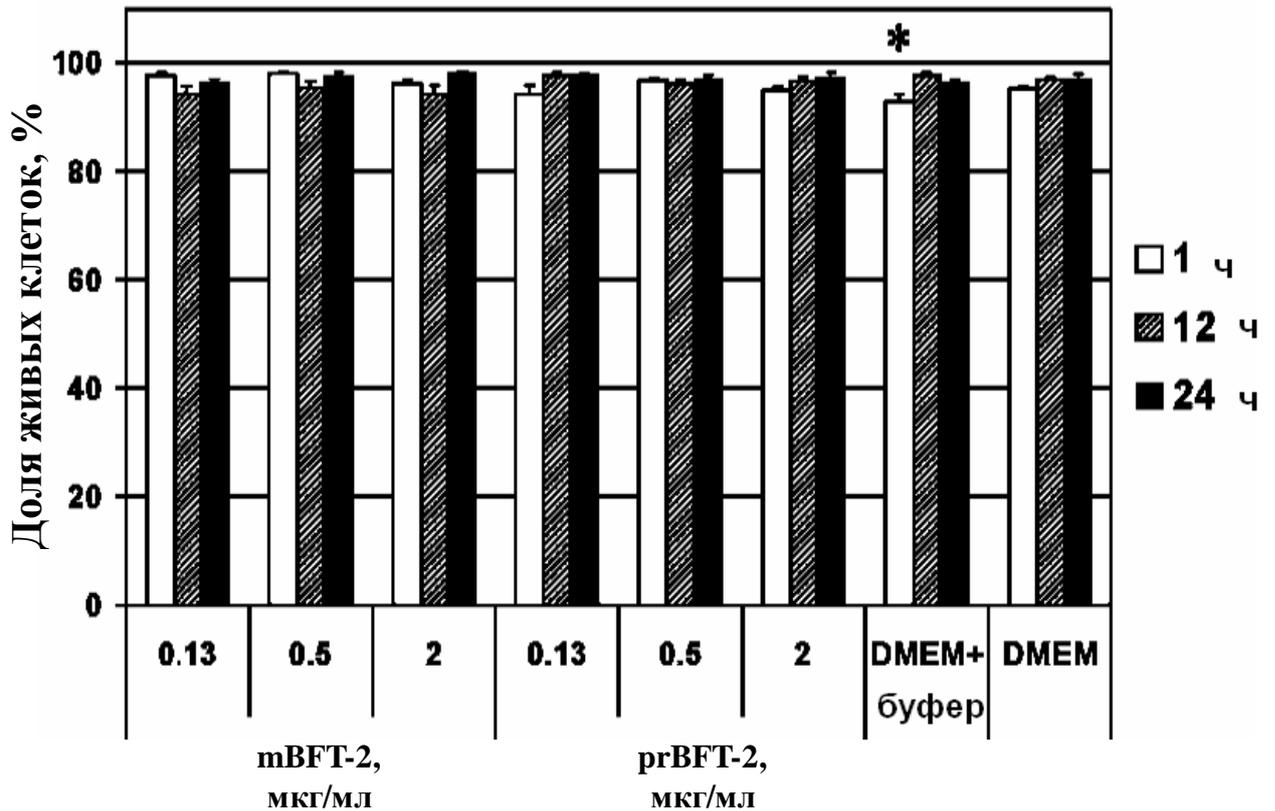


Рисунок 27. Жизнеспособность клеток после обработки различными концентрациями mBFT2-His и prBFT2-His в течение 1, 12 и 24 ч. В качестве контролей использовали клетки, инкубированные в среде DMEM, а также в DMEM с добавлением буфера, который использовали для хранения белков. Звездочкой отмечена проба, которая имела статистически значимые отличия от восьми других образцов.

Анализ индукции апоптоза клеток HT-29 после обработки рекомбинантными белками показал, что в опытных и контрольных лунках имеется не более 20 клеток, положительных по окрашиванию TUNEL. Поскольку общее число клеток в лунке составляет около 10^5 , различия между экспериментальными и контрольными лунками недостоверны. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что обработка клеток HT-29 рекомбинантными BFT не влияет на жизнеспособность клеток.

3.10. Тестирование протеолитической активности рекомбинантных ВФТ с использованием желатина, азоколл, азоказеина и модифицированного тиоредоксина

Далее мы решили охарактеризовать протеолитическую активность полученных рекомбинантных mBFT, используя ряд ранее описанных субстратов. По литературным данным, изоформа 1 расщепляет желатин и азоколл (Moncrief *et al.*, 1995), а изоформа 3 – азоказеин и азоколл (Goulas *et al.*, 2011). Мы выявили, что все зрелые ВФТ (как слитые с последовательностью из шести остатков гистидина, так и без нее), полученные в данной работе (белки №№ 2-8 в таблице 9), не расщепляют азоколл, азоказеин и желатин как в присутствии ионов цинка, так и без них. Возможно, метод выделения ВФТ, разработанный нами, позволяет получить препараты без примесей, которые могут приводить к расщеплению таких субстратов, как азоколл, азоказеин, желатин. Следует отметить, что эти субстраты расщепляются многими протеиназами и часто используются для определения общей протеолитической активности препарата (Chavira *et al.*, 1984, Vazquez Peyronel and Cantera, 1995, Vermelho *et al.*, 1996).

Ранее S.A. Shiryaev с соавторами (Shiryaev *et al.*, 2013) использовали комбинаторную библиотеку пептидов и выявили характерный мотив для расщепления ВФТ-3 - Pro-X-X-Leu-(Arg/Ala/Leu)↓, а также наиболее предпочтительные аминокислотные остатки в позициях, обозначенных X. Основываясь на этих данных, мы решили получить рекомбинантный белок, содержащий в себе потенциальные сайты для расщепления ВФТ. Этот белок затем использовали для определения активности ВФТ. В качестве вектора для экспрессии мы выбрали плазмиду pET-32a(+) (Novagen, США). Кодированный ей белок тиоредоксин накапливается в цитоплазме *E. coli* в больших количествах и является растворимым. За последовательностью ДНК, кодирующей тиоредоксин, находится полилинкер, включающий в себя уникальные сайты рестрикции. Мы встроили в этот полилинкер

последовательности, кодирующие сайты расщепления, предсказанные для BFT-3 (PRPLRA, PRGLRA, PRPLAA, PAPLRA, PAGLAA) (Shiryaev *et al.*, 2013). Полученные плазмиды использовали для наработки рекомбинантных белков в *E. coli*. Эти белки имеют общую молекулярную массу 20 кДа. В случае расщепления встроенного участка образуются два фрагмента с массами 16 кДа и 4 кДа. Разницу молекулярных масс исходного белка и предполагаемого продукта расщепления массой 16 кДа легко детектировать путем электрофореза в ПААГ.

Мы инкубировали тиоредоксины со встроенными потенциальными сайтами для расщепления с рекомбинантными BFT (рисунок 28).

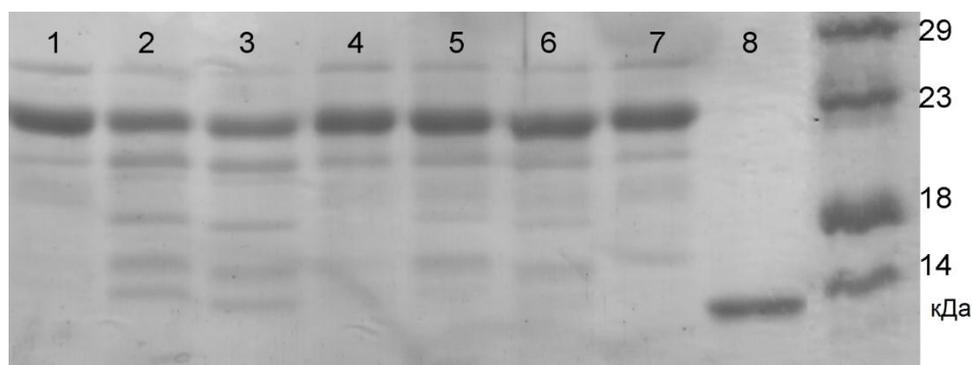


Рисунок 28. Электрофоретический анализ проб тиоредоксина со встроенным сайтом PRPLRA (Trx-Ln1) после инкубации с BFT. 1 – исходный препарат тиоредоксина со встроенным линкером; далее – препараты после инкубирования с: 2 – mBFT2-His 5 мкг/мл; 3 – mBFT2-His 5 мкг/мл и 5 мМ ЭДТА; 4 – mBFT2-His 5 мкг/мл и 2 мМ PMSF; 5 – mBFT2-E349A 5 мкг/мл; 6 – mBFT2-E349A 5 мкг/мл и 5 мМ ЭДТА; 7 – mBFT2-E349A 5 мкг/мл и 2 мМ PMSF, 8 – трипсином.

Однако мы не обнаружили расщепления модифицированных тиоредоксинов. Возможное объяснение данного факта заключается в том, что структура субстрата, помимо непосредственно сайта протеолиза, также важна для его узнавания BFT и последующего расщепления.

3.11. Исследование способности рекомбинантных rgBFT к автопротеолизу

Нами не было выявлено автопротеолиза рекомбинантных rgBFT всех трех изоформ, как слитых с последовательностью из шести остатков гистидина, так и без нее.

3.12. Исследование E-кадгерина в качестве потенциального субстрата для BFT

Следующая часть работы была посвящена поиску природного субстрата для BFT. Поскольку после обработки клеток линии HT-29 BFT 1, 2, 3 наблюдается расщепление E-кадгерина, можно было предположить, что этот белок является субстратом для BFT. Мы получили рекомбинантный E-кадгерин в *E. coli* и выделили его при помощи метал-хелатной хроматографии. Мы не наблюдали расщепления рекомбинантного E-кадгерина, выделенного из *E.coli* при инкубации его с mBFT1-His, mBFT2-His и mBFT3-His. Это может быть объяснено как тем, что посттрансляционные модификации E-кадгерина и/или его нативная конформация на клеточной мембране важны для узнавания E-кадгерина BFT и последующего расщепления, так и тем, что E-кадгерин не является непосредственным субстратом для BFT. Для проверки этих возможностей мы провели ряд дополнительных экспериментов.

С целью выявить, способствуют ли посттрансляционные модификации, отсутствующие в рекомбинантном E-кадгерине, полученном из *E.coli*, его расщеплению под действием BFT, мы выделили рекомбинантный E-кадгерин из клеток человека линии Ecr1293F. В этом случае мы по-прежнему не наблюдали расщепления E-кадгерина ни одной из изоформ BFT. Также мы не обнаружили активность рекомбинантных mBFT1-His, mBFT2-His, mBFT3-His по отношению к E-кадгерину, экстрагированному из обогащенной

фракции мембран клеток линии HT-29 с помощью TritonX-100. Мы предположили, что для активности BFT необходима связь с липидами мембраны. Была получена фракция, обогащенная мембранами, из клеток линии HT-29. Однако, при инкубации этой фракции с BFT всех трех изоформ расщепления E-кадгерина по-прежнему не происходило (рисунок 29).

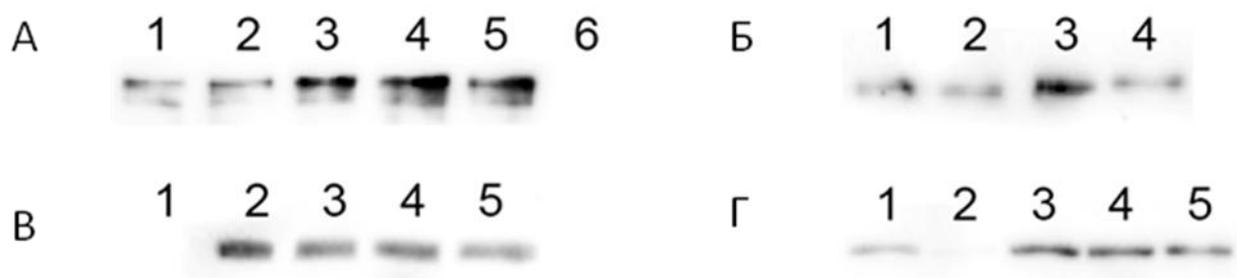


Рисунок 29. Вестерн-блот гибридизация со специфическими антителами образцов очищенного E-кадгерина после инкубации с BFT. А. В качестве субстрата использован рекомбинантный E-кадгерин, выделенный из клеток Epcr1293F. 1-3 – E-кадгерин после инкубации с mBFT1-His, mBFT2-His, mBFT3-His, соответственно, 4 – контроль, E-кадгерин после инкубации с буфером, 5 – исходный препарат рекомбинантного E-кадгерина, 6 – E-кадгерин после инкубации с трипсином. Б. Белки, экстрагируемые TritonX-100 из обогащенной фракции мембран клеток линии HT-29, после инкубации с: 1 – буфером, 2-4 – mBFT1-His, mBFT2-His, mBFT3-His, соответственно. В. Та же фракция, что и в случае В, после диализа, после инкубации с: 1 – трипсином, 2 – буфером, 3-5 – mBFT1-His, mBFT2-His, mBFT3-His, соответственно. Г. Обогащенная фракция мембран из клеток линии HT-29 после инкубации с: 1 – буфером, 2 – трипсином, 3-5 – mBFT1-His, mBFT2-His, mBFT3-His, соответственно. Рекомбинантные BFT и трипсин использовали в концентрации 5 мкг/мл.

При этом обработка целых клеток HT-29 этими же препаратами BFT приводила к расщеплению E-кадгерина.

3.13. Влияние структуры цинк-связывающего мотива на активность BFT

В составе BFT имеется цинк-связывающий мотив, характерный для металлопротеиназ клана метцинкина – HEXXHXXGXXH (Moncrief *et al.*,

1995). Мы проверили, необходима ли нативная структура этого мотива для проявления эффекта BFT на культуре клеток НТ-29. Для этого мы ввели мутации в цинк-связывающий мотив BFT. В этом мотиве остатки гистидина (H348, H352, H358) хелатируют ион цинка, который необходим для катализа, так же как и остаток глутаминовой кислоты (E349). Известно, что мутации в цинк-связывающем мотиве металлопротеиназ приводят к потере протеолитической активности, и, как следствие, функции белка.

Мы получили мутантные BFT с заменами каталитического остатка глутаминовой кислоты на остатки аланина, а также с заменами остатков гистидина, хелатирующих ион цинка, на остатки тирозина (таблица 10).

Таблица 10.

Рекомбинантные мутантные BFT, полученные в данной работе.

№	Название	Изоформа	Описание	6xHis	Мутации	Расщепление Е-кадгерина (клетки НТ- 29)
1.	mBFT1- E349A	1	Зрелый BFT, получен из ргBFT, ренатурированного из телец включения <i>E. coli</i>	-	E349A	- (рисунок 30)
2.	mBFT2- E349A	2	Аналогично №1	-		- (рисунок 30)
3.	mBFT3- E349A	3	Аналогично №1	-		- (рисунок 30)
4.	mBFT2-НУ	2	Аналогично №1	-	H348Y, H352Y, H358Y	- (рисунок 30)

Такие белки не проявляли активности в отношении клеток линии НТ-29, т.е. не вызывали изменения их морфологии и не индуцировали расщепление Е-кадгерина (рисунок 30).

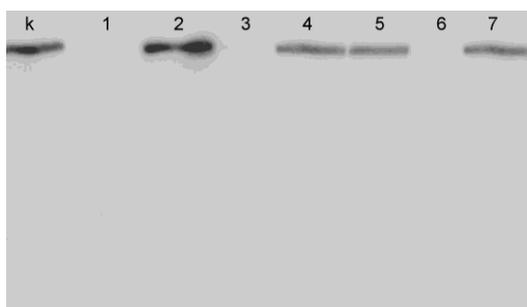


Рисунок 30. Вестерн-блот гибридизация с антителами к E-кадгерину лизатов клеток HT-29 после инкубации с рекомбинантными BFT. Лизат культуры клеток HT-29 после обработки в течение 1 ч: К – 1^х PBS (контроль); 1 – mBFT1-min; 2 – mBFT1-E349A; 3 – mBFT2-min; 4 – mBFT2-E349A; 5 – mBFT2-HY; 6 – mBFT3-min; 7 – mBFT3-E349A. Все рекомбинантные белки были использованы в концентрации 1 мкг/мл.

Таким образом, для проявления биологической активности BFT важна нативная структура активного центра, характерного для металлопротеиназ. В то же время зрелые рекомбинантные BFT не расщепляют E-кадгерин, выделенный из различных источников. Поэтому следующим этапом нашей работы стал поиск других белков, которые потенциально могли бы быть субстратами для BFT.

3.14. Выявление белков, высвобождающихся в культуральную среду после обработки клеток HT-29 mBFT2-His

Мы провели тандемную хромато-масс спектрометрию образцов культуральной среды клеток линии HT-29, обработанных mBFT2-His. При этом использовали два способа пробоподготовки: трипсинолиз образцов в растворе с DTT и сурфактантом RapiGest, или же только с DTT. Белки идентифицировали при помощи Mascot search engine v2.2.07 и базы данных UniProt (The UniProt Consortium, ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/complete/). Количество идентифицированных белков для каждого из повторов представлено в таблице 11. Количество выявленных пептидов для каждого белка приведено в таблице S3, доступной по ссылке <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.05.003> (Kharlampieva *et al.*, 2015).

Количество белков, идентифицированных в культуральной среде после обработки клеток НТ-29 белком mBFT2-His.

	Количество идентифицированных белков (пробоподготовка с DTT)	Количество идентифицированных белков (пробоподготовка с DTT и RapiGest)
Контроль – повтор 1	1027	1433
Эксперимент – повтор 1	1310	1462
Контроль – повтор 2	1165	1489
Эксперимент – повтор 2	1151	1648
Контроль – повтор 3	1521	1543
Эксперимент – повтор 3	1560	1345

Для анализа изменения количества белков мы рассчитывали их индекс представленности (Exponentially Modified Protein Abundance Index, emPAI), по следующей формуле:

$emPAI = 10^{PAI} - 1$, где $PAI = N_{obsd} / N_{obsbl}$, N_{obsd} – количество триптических пептидов для данного белка, идентифицированных в эксперименте, N_{obsbl} – общее количество триптических пептидов для данного белка, рассчитанное *in silico*. Показано, что emPAI прямо пропорционален концентрации белка (Ishihama *et al.*, 2005). emPAI для каждого идентифицированного белка приведен в таблице S4, доступной по ссылке <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.05.003> (Kharlampieva *et al.*, 2015). Нами были построены тепловые карты, демонстрирующие изменения в содержании белков в культуральной среде после обработки клеток линии НТ-29 белком mBFT2-His (рисунок 31).

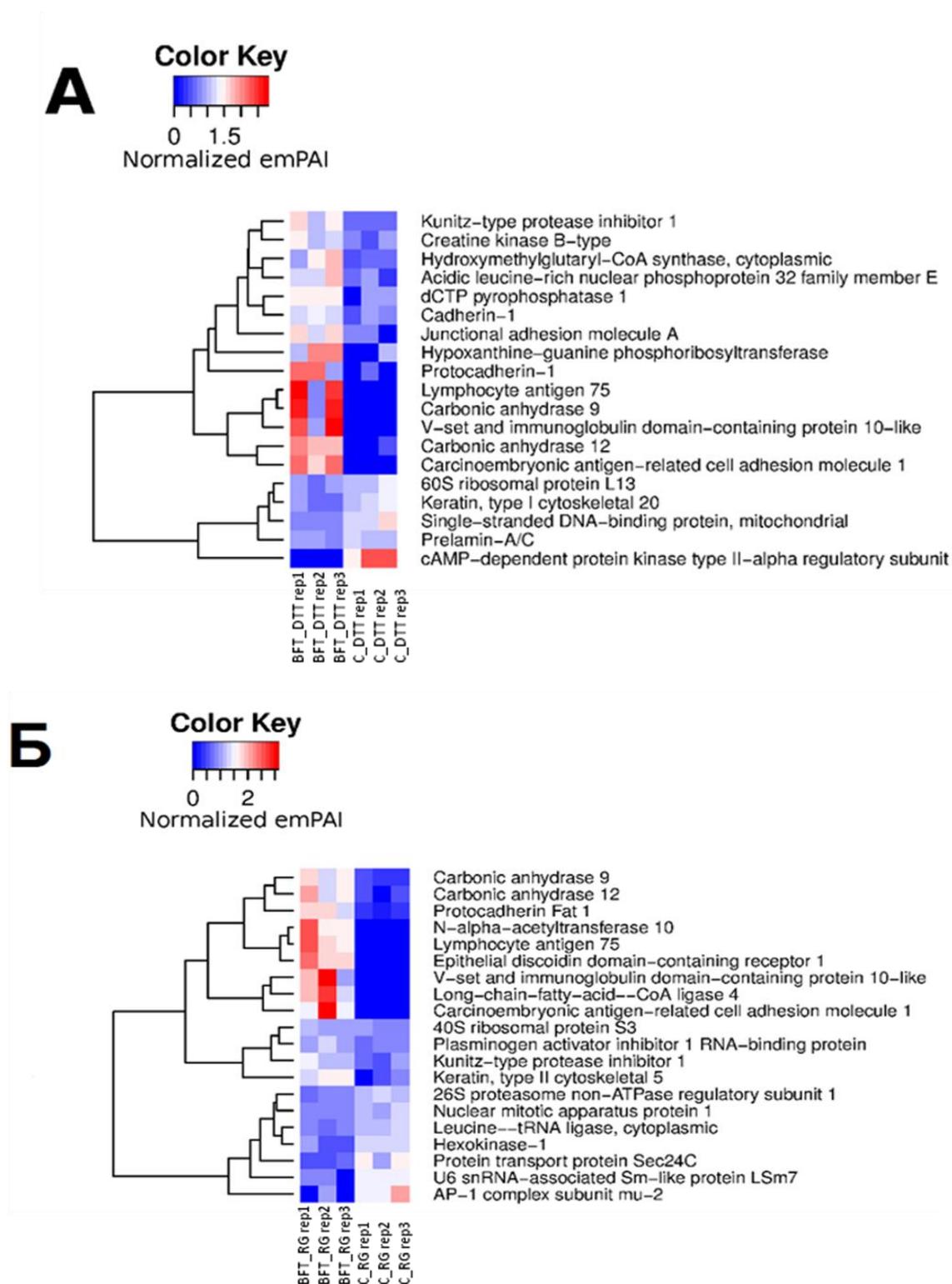


Рисунок 31. Анализ содержания белков в культуральной среде после обработки клеток HT-29 белком mBFT2-His. Тепловые карты были построены с использованием библиотеки *gplots* для языка программирования R. emPAI - Exponentially Modified Protein Abundance Index, индекс представленности белка, С – контроль, BFT – опыт, rep1 – первый биологический повтор, rep2 – второй биологический повтор, rep3 – третий биологический повтор. А – тепловая карта (способ проподготовки с DTT), Б – тепловая карта (способ пробоподготовки с RapiGest и DTT).

Как видно из рисунка 31, в культуральной среде после обработки клеток HT-29 mBFT2-His возрастает количество таких белков, как Kunitz-type protease inhibitor 1 (Swiss-Prot acc. O43278), lymphocyte antigen 75 (Swiss-Prot acc. O60449), carbonic anhydrase 9 (Swiss-Prot acc. Q16790) и carbonic anhydrase 12 (Swiss-Prot acc. O43570), V-set and immunoglobulin domain-containing protein 10-like (Swiss-Prot acc. Q86VR7), carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (P13688). Кроме того, были обнаружены белки, принадлежащие к суперсемейству кадгеринов - E-cadherin (Swiss-Prot acc. P12830), protocadherin-1 (Swiss-Prot acc. Q08174) и protocadherin Fat 1 (Swiss-Prot acc. Q14517).

Таким образом, мы впервые идентифицировали белки, высвобождающиеся в культуральную среду после обработки клеток HT-29 BFT.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют, что *B. fragilis* может выступать в роли как симбиотической бактерии, так патогенной. Существуют энтеротоксигенные штаммы (ЕТВФ), продуцирующие во внешнюю среду 20 кДа белок – ВФТ. Показана ассоциация ЕТВФ с развитием диареи, воспалительных заболеваний кишечника и даже рака (Basset *et al.*, 2004, Boleij *et al.*, 2015, Prindiville *et al.*, 2000, Toprak *et al.*, 2006, Wu *et al.*, 2009).

До настоящего времени в GenBank была доступна информация о полных геномах только неэнтеротоксигенных штаммов *B. fragilis*. В то же время информация о геноме энтеротоксигенных штаммов может быть использована для выяснения механизмов их патогенности. В рамках данной работы была определена полная нуклеотидная последовательность генома *B. fragilis* изолята BOB25. Наиболее значимым отличием в геноме *B. fragilis* изолята BOB25 от опубликованных ранее геномов *B. fragilis* неэнтеротоксигенных штаммов NCTC9343, YCH46 и 638R является наличие островка патогенности, в составе которого присутствуют гены, кодирующие металлопротеиназы – ВФТ-2 и МРП. Ранее предполагалось, что МРП может участвовать в созревании ВФТ, а ее воздействие на эукариотические клетки не было изучено (Moncrief *et al.*, 1998). Однако в последнее время была опубликована работа, в которой показано, что обработка МРП не приводит к превращению про-формы ВФТ в зрелый белок (Shiryayev *et al.*, 2013). В другом исследовании продемонстрировано, что МРП способна связываться с Е-кадгеринном на поверхности эпителиальных клеток, однако, в отличие от ВФТ, не оказывает влияния на его расщепление (Remacle *et al.*, 2014).

ВФТ считается металлопротеиназой и содержит цинк-связывающий мотив, характерный для металлопротеиназ клана метцинкина, однако его природный субстрат не выявлен. Данные литературы о субстратах, с помощью которых тестировали ВФТ *in vitro*, неполные и разрозненные. В

частности, отсутствуют работы, в которых все три изоформы BFT были бы выделены из одного источника одним и тем же методом и охарактеризована их активность по отношению к одним и тем же субстратам. Данная работа посвящена получению рекомбинантных изоформ BFT *B. fragilis* и исследованию их активности, в том числе предпринята попытка выявления потенциальных природных субстратов для BFT.

В природных условиях токсин *B. fragilis* синтезируется в виде препробелка, состоящего из сигнального пептида и двух доменов. В процессе созревания сигнальный пептид и N-концевой домен отщепляются, а C-концевой домен представляет собой активную форму токсина (Franco *et al.*, 1997). Исходя из этого, мы получили штаммы-продуценты *E. coli*, синтезирующие как каталитический домен BFT (CD-BFT, изоформа 2), так и про-форму BFT (prBFT, три известные изоформы), состоящую из двух доменов (продомена и каталитического домена). В клетках *E. coli* рекомбинантные полипептиды накапливались в нерастворимом виде. Вследствие этого, очистку белка путем металл-хелатной хроматографии проводили в денатурирующих условиях, после чего белки рефолдировали путем диализа образцов против фосфатного буфера.

На следующем этапе из хроматографически очищенных prBFT получали зрелые белки. Механизм, по которому происходит расщепление пробелка в природных условиях, неизвестен. Не установлено, происходит ли отщепление продомена в периплазме *B. fragilis* и наружу секретруется зрелый белок, представленный каталитическим доменом, или же происходит секреция пробелка, процессинг которого осуществляется внеклеточными протеиназами (Franco *et al.*, 1997, Sears, 2009). Franco A. с соавторами продемонстрировали *in vivo*, что мутации в цинк-связывающем мотиве каталитического домена prBFT не приводят к нарушению процессинга пробелка, что исключает автопротеолиз в качестве единственного механизма активации предшественника (Franco *et al.*, 2005). Нами было показано, что инкубирование рекомбинантных prBFT, растворенных в 1^x PBS, в течение

суток при +37°C или до нескольких недель при +4°C не приводило к детектируемому расщеплению данных белков.

В работе (Franco *et al.*, 1997) приводятся сведения о сайте расщепления изоформ 1 и 2 ргВFT при созревании – Arg211-Ala212. Goulas T. с соавторами (Goulas *et al.*, 2011) предположили, что в природе этот процесс может осуществлять трипсин, поскольку *B. fragilis* является обитателем кишечника, где присутствует данная протеиназа. Исходя из этого, нами разработан способ получения активных ВFT путем ограниченного трипсинолиза пробелков, который описан в п. 2.20. При помощи секвенирования по Эдману показано, что N-концевая последовательность белка, составляющего мажорную фракцию после проведения ограниченного трипсинолиза ргВFT2-His, соответствует N-концевой последовательности (AVPSEP) (Franco *et al.*, 1997) каталитического домена зрелого ВFT-2, секретируемого *B. fragilis*, что свидетельствует о корректном процессинге пробелка *in vitro*.

Таким образом, в ходе данной работы впервые были получены рекомбинантные ВFT изоформ 1 и 2 в гетерологичной системе *E. coli*. Предложенный нами способ выделения и очистки рекомбинантных ВFT характеризуется на порядок большим выходом, чем описанные в литературе (Van Tassell *et al.*, 1992, Wu *et al.*, 2002) способы выделения данной протеиназы из культуральной среды *B. fragilis* (500-1000 мкг активного зрелого ВFT, выделенного из биомассы *E. coli* с 1 л среды, против 32-80 мкг ВFT из 1 л культуральной жидкости *B. fragilis*).

В процессе оптимизации выделения рекомбинантных зрелых ВFT мы исключили стадию очистки ргВFT из солубилизованных телец включения с помощью метал-хелатной хроматографии. Рекомбинантный ргВFT составлял около 90% всех белков телец включения, поэтому мы подвергали ограниченному трипсинолизу неочищенный белок из телец включения, предварительно растворенных в 8М мочеvine и диализованных против 1^x PBS. В дальнейшем выделяли зрелый ВFT при помощи метал-хелатной

аффинной хроматографии. Таким образом, предложенная нами схема выделения рекомбинантного зрелого BFT включает в себя следующие этапы: разрушение клеток штамма-продуцента ультразвуком – центрифугирование – солюбилизация и диализ телец включения – ограниченный трипсинолиз – метал-хелатная хроматография.

На рисунке 32 приведены схематичные изображения рекомбинантных BFT, полученных в гетерологичной системе *E. coli* в различных исследованиях.

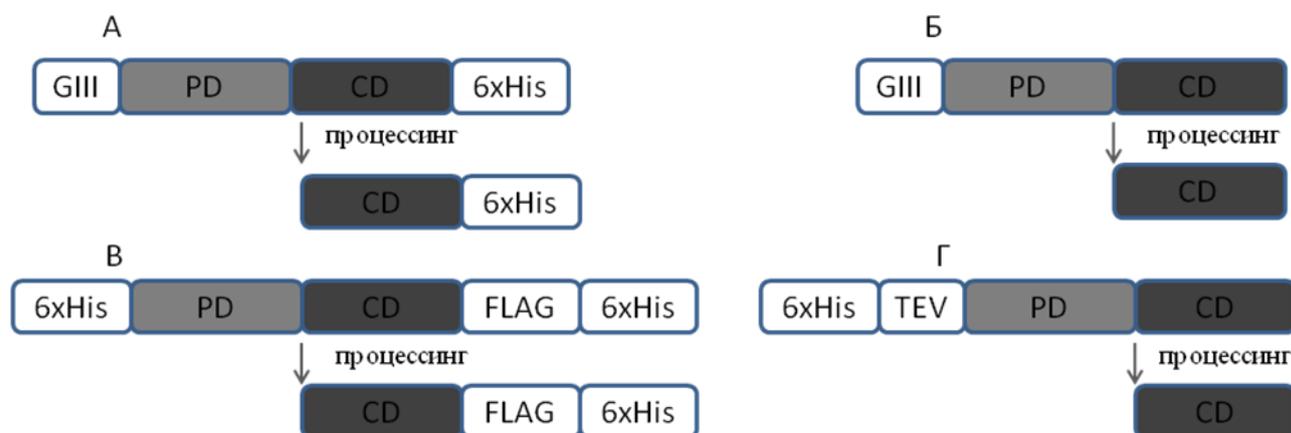


Рисунок 32. Схемы рекомбинантных BFT, полученных в гетерологичной системе *E. coli* в нашей работе (А, Б), а также в работах (Remacle *et al.*, 2014, Shiryaev *et al.*, 2014, Shiryaev *et al.*, 2013) (В) и (Goulas *et al.*, 2011) (Г). GIII – сигнальный пептид белка GIII бактериофага fd; PD – продомен BFT; CD – каталитический домен BFT, 6xHis – последовательность из шести остатков гистидина; FLAG – FLAG эпитоп; TEV – сайт расщепления для протеиназы вируса гравировки табака.

В работах (Goulas *et al.*, 2011, Remacle *et al.*, 2014, Shiryaev *et al.*, 2014, Shiryaev *et al.*, 2013) исследовали только BFT-3. При этом авторы использовали белки, слитые с FLAG-эпитопом и последовательностью из шести остатков гистидина. В нашей работе мы получали все три известные изоформы BFT, как слитые с последовательностью из шести остатков гистидина, так и без нее, для исключения ее влияния на активность белка. Goulas Т. с коллегами получали зрелый BFT-3 без полигистидиновой последовательности, однако предложенный ими способ выделения включает

в себя большее количество стадий: разрушение клеток – центрифугирование – метал-хелатная аффинная хроматография растворимой фракции *E. coli* – обработка TEV-протеиназой – метал-хелатная аффинная хроматография – ультрафильтрация – гель-фильтрация – ограниченный трипсинолиз – диализ – анионообменная хроматография – ультрафильтрация – гель-фильтрация.

Активность выделенных рекомбинантных BFT оценивали по методу Weikel C.S. (Weikel *et al.*, 1992), а именно по изменению морфологии клеток HT-29 (округлению), а также по расщеплению E-кадгерина клеток данной линии (Wu *et al.*, 1998) после обработки BFT. Мы показали, что обработка зрелыми немутантными BFT (mBFT) всех трех изоформ вызывает изменение морфологии клеток линии HT-29, которые приобретают ярко выраженную шарообразную форму (рисунок 25). Однако, воздействие на те же клетки pro-формы BFT (prBFT, состоит из продомена и каталитического домена) или рекомбинантного каталитического домена BFT (BFT2-CD) не приводит ни к каким значимым изменениям в морфологии. Методом Вестерн-блот гибридизации с антителами к E-кадгерину показано, что обработка клеток HT-29 mBFT приводит к полному расщеплению E-кадгерина, в то время как при инкубации с prBFT (рисунок 26) или BFT2-CD расщепления E-кадгерина не наблюдается. Возможно, что N-концевой домен BFT-2 участвует в процессе образования пространственной структуры, т.е. служит внутримолекулярным шапероном для каталитического домена. Кроме того, N-концевой домен блокирует каталитическую активность C-концевого домена. Это согласуется с данными, полученными для BFT-3 (Goulas *et al.*, 2011).

Далее мы решили охарактеризовать протеолитическую активность полученных рекомбинантных mBFT, используя ряд ранее описанных субстратов. Согласно литературным данным, изоформа 1 расщепляет желатин и азоколл (Moncrief *et al.*, 1995), а изоформа 3 – азоказеин и азоколл (Goulas *et al.*, 2011). Мы выявили, что все рекомбинантные mBFT (как слитые с последовательностью из шести остатков гистидина, так и без нее),

полученные в данной работе (белки №№ 2-7 в таблице 9), не расщепляют азоколл, азоказеин и желатин. Мы видим два объяснения: неправильный фолдинг рекомбинантных BFT или же отсутствие примесей в препаратах белков, полученных нами в *E. coli* (в отличие от препаратов, полученных из культуральной жидкости *B. fragilis*). Против первого предположения есть два серьезных аргумента. Во-первых, рекомбинантные BFT, полученные нами, демонстрируют такую же активность в отношении клеток линии HT-29, какая описана в литературе для BFT, синтезируемого *B. fragilis* (т.е. вызывают округление клеток HT-29 и расщепление E-кадгерина интактных HT-29). Во-вторых, каталитические домены полученных нами рекомбинантных BFT демонстрируют значительную устойчивость к трипсинолизу, как это описано для BFT, вырабатываемого *B. fragilis* (Van Tassell *et al.*, 1992). Чтобы окончательно исключить предположение о неправильной укладке целевого белка, мы получили рBFT-2, который накапливался в растворимой фракции *E. coli*. Мы очистили этот белок и далее получили его зрелую форму (mBFT2-His-Sol). Далее мы выявили, что mBFT2-His-Sol вызывает изменение морфологии клеток HT-29 и индуцирует расщепление E-кадгерина в клетках этой линии, так же как и mBFT2-His, полученный путем ограниченного трипсинолиза рBFT2-His, ренатурированного из телец включения. В то же время, mBFT2-His-Sol не расщепляет азоколл и желатин. При этом при проведении гель-фильтрации было выявлено, что и mBFT2-His и mBFT2-His-Sol образуют высокомолекулярные комплексы. Таким образом, его свойства не отличаются от свойств ренатурированного белка, по крайней мере, на качественном уровне. Однако следует отметить, что рBFT2-His-Sol накапливался в растворимой фракции *E. coli* в значительно меньших количествах, чем в тельцах включения. Кроме того, целевой белок составляет около 90% от белков телец включения, в то время как растворимая фракция *E. coli* содержит большое количество других белков, помимо целевого. Поскольку белки, выделенные из растворимой фракции *E. coli* и

рефолдированные из телец включения, демонстрировали одинаковую активность по отношению к клеткам HT-29 и неспецифическим субстратам, мы проводили последующие эксперименты с рефолдированными белками.

Таким образом, мы склоняемся к выводу, что предложенный нами способ выделения рекомбинантного рrBFT из телец включения *E. coli* и последующий перевод его в активную форму путем ограниченного трипсинолиза позволяет избавиться от примесей, которые могут приводить к расщеплению таких неспецифических для фрагилизина субстратов протеиназ, как азоколл, азоказеин и желатин. Тем не менее, такие субстраты, как желатин, азоколл и азоказеин, не являются природными для BFT и сведения об активности BFT в отношении них не дают представления о возможных различиях в механизмах действия изоформ BFT *in vivo*.

Таким образом, для выявления прямой протеолитической активности рекомбинантных BFT требуется более специфичный субстрат. В работе (Shiryayev *et al.*, 2013) авторы исследовали активность рекомбинантного BFT-3 на комбинаторной библиотеке пептидов и выявили характерный мотив для расщепления Pro-X-X-Leu-(Arg/Ala/Leu). Основываясь на этих данных, мы получили рекомбинантные тиоредоксины со встроенными предсказанными сайтами для расщепления BFT-3 (PRPLRA, PRGLRA, PRPLAA, PAPLRA, PAGLAA) и инкубировали их с рекомбинантными BFT. При этом расщепления модифицированных тиоредоксинов детектировано не было. В отличие от исследования S.A. Shiryayev и коллег, мы использовали не пептиды, а белок со встроенными потенциальными сайтами расщепления. Мы предполагаем, что BFT обладает конформационной специфичностью, т.е. для распознавания и расщепления субстрата важно не только наличие определенных аминокислотных остатков рядом с сайтом расщепления, но и третичная структура субстрата.

Следующая часть работы была посвящена поиску природного субстрата для BFT. Поскольку BFT по структуре активного центра гомологичны другим металлопротеиназам и после обработки клеток линии

HT-29 BFT-1, BFT-2, BFT-3 наблюдается расщепление E-кадгерина, можно предположить, что BFT – протеиназа, субстратом которой является E-кадгерин. В своей работе мы выявили, что рекомбинантные зрелые BFT трех изоформ вызывают расщепление E-кадгерина интактных клеток HT-29 и не расщепляют рекомбинантный E-кадгерин, выделенный из *E. coli* и клеток Epr1293F, а также E-кадгерин во фракциях, полученных из клеток линии HT-29. Полученные данные свидетельствуют о том, что механизм гидролиза E-кадгерина под действием BFT сложнее, чем прямое расщепление полипептида протеиназой. Способность некоторых протеиназ расщеплять E-кадгерин была описана ранее (см. обзор (Grabowska and Day, 2012)). Например, было показано расщепление иммунопреципитированного E-кадгерина эукариотическими металлопротеиназами MMP-7 и меприном β , а также цистеиновой протеиназой Kgp (одним из гингипаинов) *Porphyromonas gingivalis* (Huguenin *et al.*, 2008, Katz *et al.*, 2002). Для других протеиназ расщепление E-кадгерина детектировали только при обработке ими интактных клеток или клеточных лизатов. Например, инкубирование с ADAM-10 (представитель семейства ADAMs – A Disintegrin and Metalloproteases) приводит к расщеплению E-кадгерина в клеточных лизатах, но не иммунопреципитированного E-кадгерина, что указывает на возможное участие других «нижестоящих» протеиназ в расщеплении E-кадгерина (Huguenin *et al.*, 2008). Таким образом, изучение расщепления E-кадгерина осложняется наличием протеолитических каскадов (Grabowska and Day, 2012). Например, показана способность MMPs активировать других членов своего семейства (Egeblad and Werb, 2002). По этой причине трудно разграничить расщепление протеиназой субстрата напрямую и активацию протеиназой промежуточного посредника, который расщепляет субстрат. В случае с BFT мы не исключаем участие клеточных протеиназ в BFT-индуцированном расщеплении E-кадгерина.

В составе BFT имеется цинк-связывающий мотив, характерный для металлопротеиназ клана метцинкина – HEXXHXXGXXH (Bode *et al.*, 1993,

Moncrief *et al.*, 1995). Мы показали, что интактная структура этого мотива необходима для проявления эффекта ВФТ на культуре клеток НТ-29. Для этого мы ввели мутации в цинк-связывающий мотив ВФТ. В этом мотиве остатки гистидина хелатируют ион цинка, который необходим для катализа, так же как и остаток глутаминовой кислоты (E349). Известно, что мутации в цинк-связывающем мотиве металлопротеиназ приводят к потере протеолитической активности и, как следствие, функции белка. Например, летальный фактор токсина сибирской язвы, который является металлопротеиназой, теряет свою летальную активность после замены остатков H686 и H690, вовлеченных в хелатирование иона цинка, на остатки аланина, а также после замены остатка глутаминовой кислоты на остаток цистеина (Klimpel *et al.*, 1994). Для металлопротеиназы *Treponema pallidum*, pallilysin (паллилизин), показано, что мутации в цинк-связывающем мотиве приводят к неспособности гидролизовать белки хозяина (Houston *et al.*, 2012).

Мы получили мутантные ВФТ (таблица 10, белки № 1-4) с заменами каталитического остатка глутаминовой кислоты на аланин, а также с заменами остатков гистидина, хелатирующих цинк, на остатки тирозина. Такие белки не проявляли активности в отношении клеток линии НТ-29 (рисунок 30). Таким образом, для проявления биологической активности ВФТ важна нативная структура активного центра, характерного для металлопротеиназ. Это заключение также косвенно подтверждается результатами ингибиторного анализа, показывающими, что добавление PMSF (ингибитора сериновых протеиназ) не оказывало влияние на активность ВФТ-2 в отношении E-кадгерина клеток линии НТ-29, в то время как в присутствии ЭДТА, хелатирующего двухвалентные катионы, расщепления E-кадгерина интактных клеток не происходило (рисунок 26). В то же время зрелые рекомбинантные немутантные ВФТ не расщепляют E-кадгерин, выделенный из различных источников. Поэтому следующим этапом нашей работы стал поиск других белков, которые потенциально могли бы быть субстратами для ВФТ.

Мы с помощью тандемной хромато-масс спектрометрии проанализировали белки, переходящие в культуральную среду после обработки BFT клеток линии HT-29 (рисунок 31). Предпосылкой для этого исследования послужила работа (Wu *et al.*, 2007), в которой было показано, что обработка BFT клеток линии HT29/C1 вызывает высвобождение белков с поверхности мембраны.

Такое явление известно в литературе и носит название «шеддинг», а протеиназы, его вызывающие, объединены под общим названием «шеддазы». Согласно литературным данным, такие протеиназы вызывают отщепление внеклеточных доменов интегральных мембранных белков или белков, закрепленных на мембране с помощью гликозилфосфатидилинозитольного якоря (Reiss and Saftig, 2009). Семейство ADAMs – одно из семейств протеиназ, вызывающих высвобождение внеклеточных доменов мембранных белков (Reiss and Saftig, 2009). В работе (Goulas *et al.*, 2011) был проведен рентгеноструктурный анализ prBFT-3 и установлено, что каталитический домен имеет значительное сходство по структуре с членами семейства ADAMs. Согласно полученным нами данным, BFT также вызывает высвобождение внеклеточных доменов интегральных мембранных белков I типа (E-cadherin, carbonic anhydrase 12, carbonic anhydrase 9, Lymphocyte antigen-75, V-set immunoglobulin domain-containing protein 10-like, Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 и других, рисунок 31, таблица 12). Таким образом, BFT можно отнести к упомянутым выше протеиназам-шеддазам. Как видно из таблицы 12, обработка BFT клеток линии HT-29 приводит к высвобождению внеклеточных фрагментов белков, участвующих в клеточной адгезии, регулирующих пролиферацию клеток, а также белков с неизвестной функцией. Кроме того, следует отметить, что среди выявленных нами белков присутствуют члены суперсемейства кадгерина (см. рисунок 31, таблица 12), которые являются также потенциальными субстратами для некоторых ADAMs (например, ADAM10,

ADAM15) (Bech-Serra *et al.*, 2006, Maretzky *et al.*, 2005, Najy *et al.*, 2008, Reiss *et al.*, 2005).

Таблица 12.

Функции мембранных белков, внеклеточные фрагменты которых высвобождаются в культуральную жидкость после обработки клеток НТ-29 mBFT2-His.

№	Swiss-Prot acc.	Название	Функции
1	P12830	Cadherin-1(E-cadherin)	Образование клеточных контактов, регуляция пролиферации. Специфичен для эпителия (Boller <i>et al.</i> , 1985, Capaldo <i>et al.</i> , 2014, Geiger and Ayalon, 1992, Kim <i>et al.</i> , 2011, Schneider and Kolligs, 2015).
2	O43570	Carbonic anhydrase-12	Регуляция pH. Описана мутация, приводящая к избыточному потоотделению с увеличенным количеством выводимых хлоридов. Участие в регулировании пролиферации клеток (Chiche <i>et al.</i> , 2010, Kivela <i>et al.</i> , 2000, Kivela <i>et al.</i> , 2005, Tafreshi <i>et al.</i> , 2014).
3	Q16790	Carbonic anhydrase-9	Регуляция pH. Возможно участие в регулировании пролиферации и трансформации (Chiche <i>et al.</i> , 2010, Kivela <i>et al.</i> , 2005, Niemela <i>et al.</i> , 2007, Tafreshi <i>et al.</i> , 2014, Zavada <i>et al.</i> , 2000).
4	Q14517	Protocadherin Fat-1	Участие в образовании контактов между клетками, регуляция пролиферации клеток (Magg <i>et al.</i> , 2005, Matakatsu and Blair, 2006, Sopko and McNeill, 2009, Takeichi, 1991, Tanoue and Takeichi, 2005).
5	Q08174	Protocadherin-1	Участие в образовании контактов между клетками. В эпителии бронхов колокализуется с E-кадгеринном. Снижение синтеза protocadherin-1 приводит к разрушению промежуточных и плотных контактов между клетками (Kozu <i>et al.</i> , 2015, Redies <i>et al.</i> , 2008, Sano <i>et al.</i> , 1993).
6	O60449	Lymphocyte antigen-75	Экспрессируется в селезенке, тимусе, кишечнике и периферических лимфоцитах. Участвует в процессинге антигенов (East and Isacke, 2002).
7	Q08345	Epithelial discoidin domain-containing receptor 1	Участвует во взаимодействии клеток с внеклеточным матриксом, регуляции миграции и пролиферации клеток (Alves F. <i>et al.</i> , 1995, Hou <i>et al.</i> , 2002, Ram <i>et al.</i> , 2006).

8	Q86VR7	V-set immunoglobulin domain-containing protein 10-like	Неизвестна.
9	P13688	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	Участвует в клеточной адгезии, найден в лейкоцитах, эпителии, эндотелии. Осуществляет адгезию клеток через гомо- и гетерофильные взаимодействия. Выполняет множество функций, в том числе участвует в дифференцировке клеток, формировании тканей, ангиогенезе, оказывает влияние на формирование и метастазирование опухолей, модулирует врожденный и приобретенный иммунный ответ (Fiori <i>et al.</i> , 2012, Gray-Owen and Blumberg, 2006, Kuespert <i>et al.</i> , 2006, Wagener and Ergun, 2000, Watt <i>et al.</i> , 2001).
10	Q9Y624	Junctional adhesion molecule A	Участвует в формировании плотных контактов между клетками эпителия (Laukoetter <i>et al.</i> , 2007, Liu <i>et al.</i> , 2000, Martin-Padura <i>et al.</i> , 1998, Van Itallie and Anderson, 2014).

Известно, что синтез многих шеддаз изменяется при разных заболеваниях (Grabowska and Day, 2012). Например, показано увеличение синтеза ADAM15 при раке простаты, груди и легких. Для другого представителя семейства ADAM, ADAM10 – показано увеличение синтеза при метастазирующей меланоме по сравнению с первичной меланомой. Также есть сведения об увеличении синтеза представителей семейства матриксных металлопротеиназ при раках различных органов. Энтеротоксигенные штаммы *B. fragilis*, продуцирующие BFT, который, в свою очередь, обладает активностью шеддаз, ассоциированы с развитием колоректального рака (Toprak *et al.*, 2006). Онкогенная роль фрагментов E-кадгерина, высвобождаемых шеддазами, подробно обсуждается в обзорах (David and Rajasekaran, 2012, Grabowska and Day, 2012). Роль других белков, высвобождаемых после обработки клеток BFT, в клеточном ответе и развитии патологических состояний остается предметом для дальнейших исследований.

Таким образом, мы выявили несколько потенциальных природных субстратов для BFT-2, однако для подтверждения этих данных требуются

дальнейшие эксперименты, поскольку необходимо исключить участие клеточных сигнальных каскадов и клеточных протеиназ в высвобождении фрагментов мембранных белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Энтеротоксигенные штаммы *B. fragilis* выделяют во внешнюю среду 20 кДа белок – VFT. Персистенция таких штаммов в кишечнике человека ассоциирована с развитием энтероколитов и даже рака. Тем не менее, неизвестна субстратная специфичность VFT и точный механизм действия на клетки. Понимание механизмов патогенности *B. fragilis* необходимо для успешной борьбы с вызываемыми им заболеваниями.

В ходе данной работы фрагменты ДНК, кодирующие три известные изоформы VFT, были встроены в плазмиды для регулируемой экспрессии в клетках *E. coli*. Были получены все три известные изоформы VFT в виде рекомбинантных белков, а также мутантные VFT с заменами в цинк-связывающем участке. При тестировании протеолитической активности VFT *in vitro* с использованием описанных в литературе субстратов выявлено, что все рекомбинантные зрелые изоформы VFT не расщепляют желатин, азоколл и азоказеин и их проформы не подвергаются автопротеолизу. В то же время было показано, что полученные рекомбинантные зрелые VFT имеют такую же биологическую активность, как и описанный в литературе VFT, вырабатываемый *B. fragilis*. При обработке клеток линии HT-29 рекомбинантными немутантными VFT выявлено изменение формы клеток – округление; а также расщепление белка, участвующего в образовании межклеточных контактов – E-кадгерина.

Нам удалось показать, что E-кадгерин не является непосредственным субстратом для VFT *in vitro*. Мы впервые продемонстрировали, что VFT не расщепляет полноразмерный рекомбинантный E-кадгерин, выделенный из *E. coli* и клеток линии Expi293F. E-кадгерин в изолированных клеточных фракциях также не расщепляется при инкубации с VFT. Подобно протеиназам семейства ADAMs, с которыми VFT имеет высокую степень структурного сходства, VFT вызывает высвобождение с поверхности клеток ряда белков. Эти белки были впервые идентифицированы в данной работе. В

дальнейшем предстоит показать роль этих белков в развитии патологий, связанных с присутствием ЕТВФ в организме человека.

ВЫВОДЫ

- Разработан способ получения и выделения активных рекомбинантных ВФТ изоформ 1, 2, 3, включающий в себя процессинг ргВФТ путем ограниченного трипсинолиза;
- полученные рекомбинантные ВФТ обладают такой же активностью в отношении клеток линии аденокарциномы толстого кишечника человека (НТ-29), как и ВФТ из природного источника – *B. fragilis*;
- впервые показано, что рекомбинантные зрелые изоформы ВФТ не расщепляют рекомбинантный полноразмерный Е-кадгерин, выделенный из *E.coli* и клеток линии Expi293F. Таким образом, ВФТ расщепляет Е-кадгерин не напрямую, как считалось ранее, а более сложным путем, пока неизвестным;
- впервые идентифицированы потенциальные природные субстраты для ВФТ, среди них – мембранные белки, участвующие в межклеточной адгезии и регулирующие пролиферацию, а также белки с неизвестными к настоящему времени функциями.

Список сокращений

ГФ – гель-фильтрация

КЭК – клетки эпителия кишечника

ПААГ – полиакриламидный гель

ТК – тирозинкиназа

Т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

ТФУ – трифторуксусная кислота

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ADAM – семейство металлопротеиназ A Disintegrin And Metalloprotease

BfPAI – островок патогенности *B. fragilis*

BFT – токсин *Bacteroides fragilis*

CD – каталитический домен

COX - циклооксигеназа

emPAI – экспоненциально модифицированный индекс представленности белка

ETBF – энтеротоксигенный штамм *B. fragilis*

FBS – фетальная бычья сыворотка

HBSS – сбалансированный солевой раствор Хэнкса

IL – интерлейкин

IPTG – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

МАРК – митоген-активируемая протеин-киназа

ММР – матриксные металлопротеиназы

mBFT – зрелый BFT, полученный путем ограниченного трипсинолиза из пробелка

NTBF – неэнтеротоксигенный штамм *B. fragilis*

PBS – фосфатно-солевой буфер

PD – продомен

PGE₂ – простагландин E2

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

prBFT – предшественник зрелого BFT, состоящий из продомена и каталитического домена

SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях

SSP-PCR – полимеразная цепная реакция с одним специфичным праймером

TEV – вирус гравировки табака

TGF – трансформирующий фактор роста

Список литературы

1. Aberle, H., Schwartz, H., and Kemler, R. Cadherin-Catenin Complex: Protein interactions and their implications for cadherin function // *J Cell Biochem.* 1996. Vol. 61. № 4. P. 514-523.
2. Alves, F., Vogel, W., Mossie, K., Millauer, B., Hoefler, H., and Ullrich, A. Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer // *Oncogene.* 1995. Vol. 10. P. 609-618.
3. Basset, C., Holton, J., Bazeos, A., Vaira, D., and Bloom, S. Are *Helicobacter* species and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* involved in inflammatory bowel disease? // *Dig Dis Sci.* 2004. Vol. 49. № 9. P. 1425-1432.
4. Bech-Serra, J. J., Santiago-Josefat, B., Esselens, C., Saftig, P., Baselga, J., Arribas, J., and Canals, F. Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of Adam17 and Adam10 by difference gel electrophoresis // *Mol Cell Biol.* 2006. Vol. 26. № 13. P. 5086-5095.
5. Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor Lef-1 // *Nature.* 1996. Vol. 382. № 6592. P. 638-642.
6. Ben-Ze'ev, A., and Geiger, B. Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer // *Curr Opin Cell Biol.* 1998. Vol. 10. № 5. P. 629-639.
7. Birchmeier, W., and 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.
8. Bode, W., Gomis-Ruth, F. X., and Stockler, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (Hexxxhxxgxxh and Met-Turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins' // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 331. № 1-2. P. 134-140.
9. Boleij, A., Hechenbleikner, E. M., Goodwin, A. C., Badani, R., Stein, E. M., Lazarev, M. G., Ellis, B., Carroll, K. C., Albesiano, E., Wick, E. C., Platz, E. A., Pardoll, D. M., and Sears, C. L. The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients // *Clin Infect Dis.* 2015. Vol. 60. № 2. P. 208-215.
10. Boller, K., Vestweber, D., and Kemler, R. Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells // *J Cell Biol.* 1985. Vol. 100. № 1. P. 327-332.
11. Brown, J. D., and Moon, R. T. Wnt signaling: Why is everything so negative? // *Curr Opin Cell Biol.* 1998. Vol. 10. № 2. P. 182-187.
12. Capaldo, C. T., Farkas, A. E., and Nusrat, A. Epithelial adhesive junctions // *F1000Prime Rep.* 2014. Vol. 6. P. 1.

13. Chambers, F. G., Koshy, S. S., Saidi, R. F., Clark, D. P., Moore, R. D., and 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.
14. Chavira, R., Jr., Burnett, T. J., and Hageman, J. H. Assaying proteinases with azocoll // *Anal Biochem*. 1984. Vol. 136. № 2. P. 446-450.
15. Chiche, J., Ilc, K., Brahim-Horn, M. C., and Pouyssegur, J. Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration // *Adv Enzyme Regul*. 2010. Vol. 50. № 1. P. 20-33.
16. Chung, G. T., Franco, A. A., Wu, S., Rhie, G. E., Cheng, R., Oh, H. B., and Sears, C. L. Identification of a third metalloprotease toxin gene in extraintestinal isolates of *Bacteroides fragilis* // *Infect Immun*. 1999. Vol. 67. № 9. P. 4945-4949.
17. Dantzig, A. H., Hoskins, J. A., Tabas, L. B., Bright, S., Shepard, R. L., Jenkins, I. L., Duckworth, D. C., Sportsman, J. R., Mackensen, D., Rosteck, P. R., Jr., and et al. Association of intestinal peptide transport with a protein related to the cadherin superfamily // *Science*. 1994. Vol. 264. № 5157. P. 430-433.
18. David, J. M., and Rajasekaran, A. K. Dishonorable Discharge: The Oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments // *Cancer Res*. 2012. Vol. 72. № 12. P. 2917-2923.
19. De Wever, O., Derycke, L., Hendrix, A., De Meerleer, G., Godeau, F., Depypere, H., and Bracke, M. Soluble cadherins as cancer biomarkers // *Clin Exp Metastasis*. 2007. Vol. 24. № 8. P. 685-697.
20. Donelli, G., Fabbri, A., and Fiorentini, C. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces cytoskeletal changes and surface blebbing in HT-29 cells // *Infect Immun*. 1996. Vol. 64. № 1. P. 113-119.
21. Dubendorff, J. W., and Studier, F. W. Controlling basal expression in an inducible t7 expression system by blocking the target T7 promoter with Lac repressor // *J Mol Biol*. 1991. Vol. 219. № 1. P. 45-59.
22. Durmaz, B., Dalgalar, M., and Durmaz, R. Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in patients with diarrhea: a controlled study // *Anaerobe*. 2005. Vol. 11. № 6. P. 318-321.
23. East, L., and Isacke, C. M. The Mannose Receptor Family // *Biochim Biophys Acta*. 2002. Vol. 1572. № 2-3. P. 364-386.
24. Egeblad, M., and Werb, Z. New functions for the Matrix Metalloproteinases in cancer progression // *Nat Rev Cancer*. 2002. Vol. 2. № 3. P. 161-174.
25. Fiori, V., Magnani, M., and Cianfriglia, M. The Expression and modulation of CEACAM1 and tumor cell transformation // *Ann Ist Super Sanita*. 2012. Vol. 48. № 2. P. 161-171.
26. 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.
27. Franco, A. A., Buckwold, S. L., Shin, J. W., Ascon, M., and Sears, C. L. mutation of the zinc-binding metalloprotease motif affects *Bacteroides*

- fragilis toxin activity but does not affect propeptide processing // *Infect Immun.* 2005. Vol. 73. № 8. P. 5273-5277.
28. Franco, A. A., Cheng, R. K., Chung, G. T., Wu, S., Oh, H. B., and Sears, C. L. Molecular evolution of the pathogenicity island of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains // *J Bacteriol.* 1999. Vol. 181. № 21. P. 6623-6633.
 29. Franco, A. A., Cheng, R. K., Goodman, A., and Sears, C. L. Modulation of Bft expression by the *Bacteroides fragilis* pathogenicity island and its flanking region // *Mol Microbiol.* 2002. Vol. 45. № 4. P. 1067-1077.
 30. Franco, A. A., Mundy, L. M., Trucksis, M., Wu, S., Kaper, J. B., and Sears, C. L. Cloning and characterization of the *Bacteroides fragilis* metalloprotease toxin gene // *Infect Immun.* 1997. Vol. 65. № 3. P. 1007-1013.
 31. Geiger, B., and Ayalon, O. Cadherins // *Annu Rev Cell Biol.* 1992. Vol. 8. P. 307-332.
 32. Gessner, R., and Tauber, R. Intestinal cell adhesion molecules. Liver-Intestine Cadherin // *Ann N Y Acad Sci.* 2000. Vol. 915. P. 136-143.
 33. Goulas, T., Arolas, J. L., and Gomis-Ruth, F. X. Structure, function and latency regulation of a bacterial enterotoxin potentially derived from a mammalian Adamalysin/Adam xenolog // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011. Vol. 108. № 5. P. 1856-1861.
 34. Grabowska, M. M., and Day, M. L. Soluble E-cadherin: more than a symptom of disease // *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012. Vol. 17. P. 1948-1964.
 35. Gray-Owen, S. D., and Blumberg, R. S. Ceacam1: contact-dependent control of immunity // *Nat Rev Immunol.* 2006. Vol. 6. № 6. P. 433-446.
 36. Guevara, T., Yiallourous, I., Kappelhoff, R., Bissdorf, S., Stocker, W., and Gomis-Ruth, F. X. Proenzyme structure and activation of astacin metallopeptidase // *J Biol Chem.* 2010. Vol. 285. № 18. P. 13958-13965.
 37. Hanahan, D. Studies on transformation of escherichia coli with plasmids // *J Mol Biol.* 1983. Vol. 166. № 4. P. 557-580.
 38. He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Identification of C-Myc as a target of the Apc pathway // *Science.* 1998. Vol. 281. № 5382. P. 1509-1512.
 39. Hermiston, M. L., and Gordon, J. I. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death // *J Cell Biol.* 1995. Vol. 129. № 2. P. 489-506.
 40. Hou, G., Vogel, W. F., and Bendeck, M. P. Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression // *Circ. Res.* 2002. Vol. 90. P. 1147-1149.

41. Houston, S., Hof, R., Honeyman, L., Hassler, J., and Cameron, C. E. Activation and proteolytic activity of the *Treponema pallidum* metalloprotease, pallilysin // PLoS Pathog. 2012. Vol. 8. № 7. P. e1002822.
42. Huber, O., Bierkamp, C., and Kemler, R. Cadherins and catenins in development // Curr Opin Cell Biol. 1996. Vol. 8. № 5. P. 685-691.
43. Huguenin, M., Muller, E. J., Trachsel-Rosmann, S., Oneda, B., Ambort, D., Sterchi, E. E., and Lottaz, D. The Metalloprotease meprinbeta processes E-cadherin and weakens intercellular adhesion // PLoS One. 2008. Vol. 3. № 5. P. e2153.
44. Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., and Mann, M. Exponentially modified protein abundance index (empai) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein // Mol Cell Proteomics. 2005. Vol. 4. № 9. P. 1265-1272.
45. Ito, K., Okamoto, I., Araki, N., Kawano, Y., Nakao, M., Fujiyama, S., Tomita, K., Mimori, T., and Saya, H. Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts // Oncogene. 1999. Vol. 18. № 50. P. 7080-7090.
46. Karin, M., and Greten, F. R. Nf-Kappab: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression // Nat Rev Immunol. 2005. Vol. 5. № 10. P. 749-759.
47. Kato, N., Liu, C. X., Kato, H., Watanabe, K., Tanaka, Y., Yamamoto, T., Suzuki, K., and Ueno, K. A New subtype of the metalloprotease toxin gene and the incidence of the three Bft subtypes among *Bacteroides fragilis* isolates in Japan // FEMS Microbiol Lett. 2000. Vol. 182. № 1. P. 171-176.
48. Katz, J., Yang, Q. B., Zhang, P., Potempa, J., Travis, J., Michalek, S. M., and Balkovetz, D. F. Hydrolysis of epithelial junctional proteins by porphyromonas gingivalis gingipains // Infect Immun. 2002. Vol. 70. № 5. P. 2512-2518.
49. Kharlampieva, D., Manuvera, V., Podgorny, O., Grafaskaia, E., Kovalchuk, S., Pobeguts, O., Altukhov, I., Govorun, V., and Lazarev, V. 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.
50. Kim, J. M., Cho, S. J., Oh, Y. K., Jung, H. Y., Kim, Y. J., and Kim, N. Nuclear Factor-Kappa B activation pathway in intestinal epithelial cells is a major regulator of chemokine gene expression and neutrophil migration induced by *Bacteroides fragilis* enterotoxin // Clin Exp Immunol. 2002. Vol. 130. № 1. P. 59-66.
51. Kim, J. M., Jung, H. Y., Lee, J. Y., Youn, J., Lee, C. H., and Kim, K. H. Mitogen-Activated Protein Kinase and Activator Protein-1 dependent signals are essential for *Bacteroides fragilis* enterotoxin-induced enteritis // Eur J Immunol. 2005. Vol. 35. № 9. P. 2648-2657.

52. Kim, J. M., Lee, J. Y., and Kim, Y. J. Inhibition of apoptosis in *Bacteroides fragilis* enterotoxin-stimulated intestinal epithelial cells through the induction of C-Iap-2 // *Eur J Immunol*. 2008. Vol. 38. № 8. P. 2190-2199.
53. Kim, J. M., Oh, Y. K., Kim, Y. J., Oh, H. B., and Cho, Y. J. Polarized secretion of Cxc chemokines by human intestinal epithelial cells in response to *Bacteroides fragilis* enterotoxin: NF-Kappa B plays a major role in the regulation of IL-8 expression // *Clin Exp Immunol*. 2001. Vol. 123. № 3. P. 421-427.
54. Kim, N. G., Koh, E., Chen, X., and Gumbiner, B. M. E-Cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. Vol. 108. № 29. P. 11930-11935.
55. Kivela, A., Parkkila, S., Saarnio, J., Karttunen, T. J., Kivela, J., Parkkila, A. K., Waheed, A., Sly, W. S., Grubb, J. H., Shah, G., Tureci, O., and Rajaniemi, H. Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors // *Am J Pathol*. 2000. Vol. 156. № 2. P. 577-584.
56. Kivela, A. J., Parkkila, S., Saarnio, J., Karttunen, T. J., Kivela, J., Parkkila, A. K., Bartosova, M., Mucha, V., Novak, M., Waheed, A., Sly, W. S., Rajaniemi, H., Pastorekova, S., and Pastorek, J. Expression of Von Hippel-Lindau tumor suppressor and tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII in normal and neoplastic colorectal mucosa // *World J Gastroenterol*. 2005. Vol. 11. № 17. P. 2616-2625.
57. Klimpel, K. R., Arora, N., and Leppla, S. H. Anthrax Toxin Lethal Factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity // *Mol Microbiol*. 1994. Vol. 13. № 6. P. 1093-1100.
58. Kling, J. J., Wright, R. L., Moncrief, J. S., and Wilkins, T. D. Cloning and characterization of the gene for the metalloprotease enterotoxin of *Bacteroides fragilis* // *FEMS Microbiol Lett*. 1997. Vol. 146. № 2. P. 279-284.
59. Koch, P. J., and Franke, W. W. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules // *Curr Opin Cell Biol*. 1994. Vol. 6. № 5. P. 682-687.
60. Koshy, S. S., Montrose, M. H., and Sears, C. L. Human intestinal epithelial cells swell and demonstrate actin rearrangement in response to the metalloprotease toxin of *Bacteroides fragilis* // *Infect Immun*. 1996. Vol. 64. № 12. P. 5022-5028.
61. Kozu, Y., Gon, Y., Maruoka, S., Kazumichi, K., Sekiyama, A., Kishi, H., Nomura, Y., Ikeda, M., and Hashimoto, S. Protocadherin-1 Is a glucocorticoid-responsive critical regulator of airway epithelial barrier function // *BMC Pulm Med*. 2015. Vol. 15. P. 80.
62. Kuespert, K., Pils, S., and Hauck, C. R. Ceacams: their role in physiology and pathophysiology // *Curr Opin Cell Biol*. 2006. Vol. 18. № 5. P. 565-571.
63. Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbitt, B. A., Williams, I. R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J. A.,

- Dermody, T. S., Nusrat, A., and Parkos, C. A. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo // *J Exp Med*. 2007. Vol. 204. № 13. P. 3067-3076.
64. Lee, J. H., Heffernan, L., and Wilcox, G. Isolation of Ara-Lac gene fusions in *Salmonella typhimurium* LT2 by using transducing bacteriophage Mu D (Apr Lac) // *J Bacteriol*. 1980. Vol. 143. № 3. P. 1325-1331.
65. Lee, N., Francklyn, C., and Hamilton, E. P. Arabinose-induced binding of AraC protein to Arai2 activates the AraBad operon promoter // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987. Vol. 84. № 24. P. 8814-8818.
66. Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F. J., Reaves, T. A., Walsh, S., Pochet, M., and Parkos, C. A. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia // *J Cell Sci*. 2000. Vol. 113 (Pt 13). P. 2363-2374.
67. Magg, T., Schreiner, D., Solis, G. P., Bade, E. G., and Hofer, H. W. Processing of the human Protocadherin Fat1 and translocation of its cytoplasmic domain to the nucleus // *Exp Cell Res*. 2005. Vol. 307. № 1. P. 100-108.
68. Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M. L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W. F., Moyer, M. P., Riecken, E. O., Buhr, H. J., and Hanski, C. Target genes of beta-catenin-t cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. Vol. 96. № 4. P. 1603-1608.
69. Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T., and Robakis, N. K. A Presenilin-1/Gamma-Secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions // *Embo j*. 2002. Vol. 21. № 8. P. 1948-1956.
70. Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. Adam10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. Vol. 102. № 26. P. 9182-9187.
71. Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., and Dejana, E. Junctional Adhesion Molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration // *J Cell Biol*. 1998. Vol. 142. № 1. P. 117-127.
72. Matakatsu, H., and Blair, S. S. Separating the adhesive and signaling functions of the Fat and Dachshous Protocadherins // *Development*. 2006. Vol. 133. № 12. P. 2315-2324.
73. McNeill, H., Ozawa, M., Kemler, R., and Nelson, W. J. Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity // *Cell*. 1990. Vol. 62. № 2. P. 309-316.
74. Meisel-Mikolajczyk, F., Kot, K., Klos, W., Rouyan, G. S., Mieszala, M., and Gamian, A. Antigenic properties of Igs extracted from *Bacteroides fragilis*

- enterotoxin producing strains // *Acta Microbiol Pol.* 1999. Vol. 48. № 2. P. 153-161.
75. Meisel-Mikolajczyk, F., Sebald, M., Torbicka, E., Rafalowska, K., and Zielinska, U. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains in Poland // *Acta Microbiol Pol.* 1994. Vol. 43. № 3-4. P. 389-392.
76. Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R. M., and Cossart, P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells // *Cell.* 1996. Vol. 84. № 6. P. 923-932.
77. Moncrief, J. S., Duncan, A. J., Wright, R. L., Barroso, L. A., and Wilkins, T. D. Molecular characterization of the fragilysin pathogenicity islet of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* // *Infect Immun.* 1998. Vol. 66. № 4. P. 1735-1739.
78. Moncrief, J. S., Obiso, R., Jr., Barroso, L. A., Kling, J. J., Wright, R. L., Van Tassell, R. L., Lyerly, D. M., and Wilkins, T. D. The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease // *Infect Immun.* 1995. Vol. 63. № 1. P. 175-181.
79. Mundy, L. M., and Sears, C. L. Detection of toxin production by *Bacteroides fragilis*: assay development and screening of extraintestinal clinical isolates // *Clin Infect Dis.* 1996. Vol. 23. № 2. P. 269-276.
80. Myers, L. L., Firehammer, B. D., Shoop, D. S., and Border, M. M. *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs // *Infect Immun.* 1984. Vol. 44. № 2. P. 241-244.
81. Myers, L. L., Shoop, D. S., and Collins, J. E. Rabbit model to evaluate enterovirulence of *Bacteroides fragilis* // *J Clin Microbiol.* 1990. Vol. 28. № 7. P. 1658-1660.
82. Myers, L. L., Shoop, D. S., Collins, J. E., and Bradbury, W. C. Diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in infant rabbits // *J Clin Microbiol.* 1989. Vol. 27. № 9. P. 2025-2030.
83. Myers, L. L., Shoop, D. S., Firehammer, B. D., and Border, M. M. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in calves // *J Infect Dis.* 1985. Vol. 152. № 6. P. 1344-1347.
84. Myers, L. L., Shoop, D. S., Stackhouse, L. L., Newman, F. S., Flaherty, R. J., Letson, G. W., and Sack, R. B. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea // *J Clin Microbiol.* 1987. Vol. 25. № 12. P. 2330-2333.
85. Najy, A. J., Day, K. C., and Day, M. L. The ectodomain shedding of E-cadherin by Adam15 supports ErbB receptor activation // *J Biol Chem.* 2008. Vol. 283. № 26. P. 18393-18401.
86. Niemela, A. M., Hynninen, P., Mecklin, J. P., Kuopio, T., Kokko, A., Aaltonen, L., Parkkila, A. K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W. S., Orntoft, T. F., Kruhoffer, M., Haapasalo, H., Parkkila, S., and Kivela, A. J. Carbonic anhydrase IX is highly expressed in hereditary nonpolyposis colorectal cancer // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007. Vol. 16. № 9. P. 1760-1766.

87. Obiso, R. J., Jr., Azghani, A. O., and Wilkins, T. D. The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells // *Infect Immun.* 1997. Vol. 65. № 4. P. 1431-1439.
88. Obiso, R. J., Jr., Lyerly, D. M., Van Tassell, R. L., and Wilkins, T. D. Proteolytic activity of the *Bacteroides fragilis* enterotoxin causes fluid secretion and intestinal damage in vivo // *Infect Immun.* 1995. Vol. 63. № 10. P. 3820-3826.
89. Overduin, M., Harvey, T. S., Bagby, S., Tong, K. I., Yau, P., Takeichi, M., and Ikura, M. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion // *Science.* 1995. Vol. 267. № 5196. P. 386-389.
90. Pouliot, Y. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily // *Bioessays.* 1992. Vol. 14. № 11. P. 743-748.
91. Prindiville, T. P., Sheikh, R. A., Cohen, S. H., Tang, Y. J., Cantrell, M. C., and Silva, J., Jr. *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease // *Emerg Infect Dis.* 2000. Vol. 6. № 2. P. 171-174.
92. Rabizadeh, S., Rhee, K. J., Wu, S., Huso, D., Gan, C. M., Golub, J. E., Wu, X., Zhang, M., and Sears, C. L. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a potential instigator of colitis // *Inflamm Bowel Dis.* 2007. Vol. 13. № 12. P. 1475-1483.
93. Ram, R., Lorente, G., Nikolich, K., Urfer, R., Foehr, E., and Nagavarapu U. J. Discoidin Domain Receptor-1a (DDR1a) promotes glioma cell invasion and adhesion in association with Matrix Metalloproteinase-2 // *Neurooncol.* 2006. Vol. 76. P. 239-248.
94. Ranscht, B., and Dours-Zimmermann, M. T. T-Cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region // *Neuron.* 1991. Vol. 7. № 3. P. 391-402.
95. Redies, C., Heyder, J., Kohoutek, T., Staes, K., and Van Roy, F. Expression of Protocadherin-1 (Pcdh1) during mouse development // *Dev Dyn.* 2008. Vol. 237. № 9. P. 2496-2505.
96. Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. Adam10 cleavage of N-Cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling // *Embo j.* 2005. Vol. 24. № 4. P. 742-752.
97. Reiss, K., and Saftig, P. The "a Disintegrin and Metalloprotease" (Adam) family of sheddases: physiological and cellular functions // *Semin Cell Dev Biol.* 2009. Vol. 20. № 2. P. 126-137.
98. Remacle, A. G., Shiryaev, S. A., and Strongin, A. Y. Distinct interactions with cellular E-cadherin of the two virulent metalloproteinases encoded by a *Bacteroides fragilis* pathogenicity island // *PLoS One.* 2014. Vol. 9. № 11. P. e113896.
99. Riegler, M., Lotz, M., Sears, C., Pothoulakis, C., Castagliuolo, I., Wang, C. C., Sedivy, R., Sogukoglu, T., Cosentini, E., Bischof, G., Feil, W., Teleky, B., Hamilton, G., LaMont, J. T., and Wenzl, E. *Bacteroides fragilis* toxin 2

- damages human colonic mucosa in vitro // *Gut*. 1999. Vol. 44. № 4. P. 504-510.
100. Rosenblum, G., Meroueh, S., Toth, M., Fisher, J. F., Fridman, R., Mobashery, S., and Sagi, I. Molecular structures and dynamics of the stepwise activation mechanism of a Matrix Metalloproteinase zymogen: challenging the cysteine switch dogma // *J Am Chem Soc*. 2007. Vol. 129. № 44. P. 13566-13574.
 101. Saidi, R. F., Jaeger, K., Montrose, M. H., Wu, S., and 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.
 102. Saidi, R. F., and 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.
 103. Salyers, A. A. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract // *Annu Rev Microbiol*. 1984. Vol. 38. P. 293-313.
 104. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual* // Cold Spring Harbor University Press, second edition, 1989. Book 1. P. 1.25-1.28.
 105. Sanfilippo, L., Baldwin, T. J., Menozzi, M. G., Borriello, S. P., and Mahida, Y. R. Heterogeneity in responses by primary adult human colonic epithelial cells to purified enterotoxin of *Bacteroides fragilis* // *Gut*. 1998. Vol. 43. № 5. P. 651-655.
 106. Sanfilippo, L., Li, C. K., Seth, R., Baldwin, T. J., Menozzi, M. G., and Mahida, Y. R. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) by human colonic epithelial cells // *Clin Exp Immunol*. 2000. Vol. 119. № 3. P. 456-463.
 107. Sano, K., Tanihara, H., Heimark, R. L., Obata, S., Davidson, M., St John, T., Taketani, S., and Suzuki, S. Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system // *Embo j*. 1993. Vol. 12. № 6. P. 2249-2256.
 108. Schneider, M. R., and Kolligs, F. T. E-cadherin's role in development, tissue homeostasis and disease: insights from mouse models: tissue-specific inactivation of the adhesion protein E-cadherin in mice reveals its functions in health and disease // *Bioessays*. 2015. Vol. 37. № 3. P. 294-304.
 109. Scotto d'Abusco, A. S., Del Grosso, M., Censini, S., Covacci, A., and Pantosti, A. The alleles of the bft gene are distributed differently among enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from human sources and can be present in double copies // *J Clin Microbiol*. 2000. Vol. 38. № 2. P. 607-612.
 110. Sears, C. L. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes // *Clin Microbiol Rev*. 2009. Vol. 22. № 2. P. 349-369.
 111. Sears, C. L. The toxins of *Bacteroides fragilis* // *Toxicon*. 2001. Vol. 39. № 11. P. 1737-1746.

112. Sears, C. L., Buckwold, S. L., Shin, J. W., and Franco, A. A. The C-terminal region *Bacteroides fragilis* toxin is essential to its biological activity // *Infect Immun*. 2006. Vol. 74. № 10. P. 5595-5601.
113. Sears, C. L., Islam, S., Saha, A., Arjumand, M., Alam, N. H., Faruque, A. S., Salam, M. A., Shin, J., Hecht, D., Weintraub, A., Sack, R. B., and Qadri, F. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea // *Clin Infect Dis*. 2008. Vol. 47. № 6. P. 797-803.
114. Sears, C. L., Myers, L. L., Lazenby, A., and Van Tassell, R. L. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* // *Clin Infect Dis*. 1995. Vol. 20 Suppl 2. P. S142-148.
115. Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R., and Hendrickson, W. A. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins // *Nature*. 1995. Vol. 374. № 6520. P. 327-337.
116. Shiryayev, S. A., Aleshin, A. E., Muranaka, N., Kukreja, M., Routenberg, D. A., Remacle, A. G., Liddington, R. C., Cieplak, P., Kozlov, I. A., and Strongin, A. Y. Structural and functional diversity of metalloproteinases encoded by the *Bacteroides fragilis* pathogenicity island // *Febs j*. 2014. Vol. 281. № 11. P. 2487-2502.
117. Shiryayev, S. A., Remacle, A. G., Chernov, A. V., Golubkov, V. S., Motamedchaboki, K., Muranaka, N., Dambacher, C. M., Capek, P., Kukreja, M., Kozlov, I. A., Perucho, M., Cieplak, P., and Strongin, A. Y. Substrate cleavage profiling suggests a distinct function of *Bacteroides fragilis* metalloproteinases (fragilysin and metalloproteinase II) at the microbiome-inflammation-cancer interface // *J Biol Chem*. 2013. Vol. 288. № 48. P. 34956-34967.
118. Sopko, R., and McNeill, H. The skinny on fat: an enormous cadherin that regulates cell adhesion, tissue growth, and planar cell polarity // *Curr Opin Cell Biol*. 2009. Vol. 21. № 5. P. 717-723.
119. Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H., and Van Wart, H. E. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990. Vol. 87. № 1. P. 364-368.
120. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes // *Methods Enzymol*. 1990. Vol. 185. P. 60-89.
121. Tafreshi, N. K., Lloyd, M. C., Bui, M. M., Gillies, R. J., and Morse, D. L. Carbonic anhydrase IX as an imaging and therapeutic target for tumors and metastases // *Subcell Biochem*. 2014. Vol. 75. P. 221-254.
122. Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator // *Science*. 1991. Vol. 251. № 5000. P. 1451-1455.
123. Tanihara, H., Sano, K., Heimark, R. L., St John, T., and Suzuki, S. Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally

- different types of cadherin // Cell Adhes Commun. 1994. Vol. 2. № 1. P. 15-26.
124. Tanoue, T., and Takeichi, M. New insights into Fat cadherins // J Cell Sci. 2005. Vol. 118. № Pt 11. P. 2347-2353.
 125. Thomson, R. B., Igarashi, P., Biemesderfer, D., Kim, R., Abu-Alfa, A., Soleimani, M., and Aronson, P. S. 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.
 126. Toprak, N. U., Yagci, A., Gulluoglu, B. M., Akin, M. L., Demirkalem, P., Celenk, T., and Soyletir, G. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer // Clin Microbiol Infect. 2006. Vol. 12. № 8. P. 782-786.
 127. Van Itallie, C. M., and Anderson, J. M. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition // Semin Cell Dev Biol. 2014. Vol. 36. P. 157-165.
 128. Van Tassell, R. L., Lyerly, D. M., and Wilkins, T. D. Purification and characterization of an enterotoxin from *Bacteroides fragilis* // Infect Immun. 1992. Vol. 60. № 4. P. 1343-1350.
 129. Vazquez Peyronel, D., and Cantera, A. M. A simple and rapid technique for postelectrophoretic detection of proteases using azocasein // Electrophoresis. 1995. Vol. 16. № 10. P. 1894-1897.
 130. Vermelho, A. B., Meirelles, M. N., Lopes, A., Petinate, S. D., Chaia, A. A., and Branquinha, M. H. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates // Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996. Vol. 91. № 6. P. 755-760.
 131. Vizcaino, J. A., Deutsch, E. W., Wang, R., Csordas, A., Reisinger, F., Rios, D., Dianes, J. A., Sun, Z., Farrah, T., Bandeira, N., Binz, P. A., Xenarios, I., Eisenacher, M., Mayer, G., and Gatto, L. Proteomexchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination // 2014. Vol. 32. № 3. P. 223-226.
 132. Wagener, C., and Ergun, S. Angiogenic properties of the Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 // Exp Cell Res. 2000. Vol. 261. № 1. P. 19-24.
 133. Watt, S. M., Teixeira, A. M., Zhou, G. Q., Doyonnas, R., Zhang, Y., Grunert, F., Blumberg, R. S., Kuroki, M., Skubitz, K. M., and Bates, P. A. homophilic adhesion of human Ceacam1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site // Blood. 2001. Vol. 98. № 5. P. 1469-1479.
 134. Weikel, C. S., Grieco, F. D., Reuben, J., Myers, L. L., and Sack, R. B. Human colonic epithelial cells, HT29/C1, treated with crude bacteroides fragilis enterotoxin dramatically alter their morphology // Infect Immun. 1992. Vol. 60. № 2. P. 321-327.
 135. Wells, C. L., van de Westerlo, E. M., Jechorek, R. P., Feltis, B. A., Wilkins, T. D., and Erlandsen, S. L. *Bacteroides fragilis* enterotoxin modulates

- epithelial permeability and bacterial internalization by HT-29 *ENTEROCYTES* // Gastroenterology. 1996. Vol. 110. № 5. P. 1429-1437.
136. Wexler, H. M. *Bacteroides*: The Good, the Bad, and the Nitty-Gritty // Clin Microbiol Rev. 2007. Vol. 20. № 4. P. 593-621.
 137. Wu, S., Dreyfus, L. A., Tzianabos, A. O., Hayashi, C., and Sears, C. L. Diversity of the Metalloprotease toxin produced by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* // Infect Immun. 2002. Vol. 70. № 5. P. 2463-2471.
 138. Wu, S., Lim, K. C., Huang, J., Saidi, R. F., and 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.
 139. Wu, S., Morin, P. J., Maouyo, D., and Sears, C. L. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-myc expression and cellular proliferation // Gastroenterology. 2003. Vol. 124. № 2. P. 392-400.
 140. Wu, S., Powell, J., Mathioudakis, N., Kane, S., Fernandez, E., and Sears, C. L. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces intestinal epithelial cell secretion of interleukin-8 through Mitogen-Activated Protein Kinases and a Tyrosine Kinase-regulated Nuclear Factor-KappaB pathway // Infect Immun. 2004. Vol. 72. № 10. P. 5832-5839.
 141. Wu, S., Rhee, K. J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H. R., Huso, D. L., Brancati, F. L., Wick, E., McAllister, F., Housseau, F., Pardoll, D. M., and Sears, C. L. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses // Nat Med. 2009. Vol. 15. № 9. P. 1016-1022.
 142. Wu, S., Rhee, K. J., Zhang, M., Franco, A., and 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.
 143. Wu, S., Shin, J., Zhang, G., Cohen, M., Franco, A., and Sears, C. L. The *Bacteroides fragilis* toxin binds to a specific intestinal epithelial cell receptor // Infect Immun. 2006. Vol. 74. № 9. P. 5382-5390.
 144. Zavada, J., Zavadova, Z., Pastorek, J., Biesova, Z., Jezek, J., and Velek, J. Human tumour-associated cell adhesion protein Mn/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion // Br J Cancer. 2000. Vol. 82. № 11. P. 1808-1813.