

ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д.1А
<http://www.niifhm.ru>

Тел. (499)246-77-21, факс: (499)246-44-09
E-mail: info@niifhm.ru

«20» 01 2016.

№ 23

УТВЕРЖДАЮ
И.о. генерального директора
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Федеральный научно-
клинический центр физико-химической
медицины Федерального медико-
биологического агентства»
член-корр. РАН, профессор



В.М. Говорун

«10» января 2016г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» на диссертационную работу Харлампиевой Д.Д. «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis* и исследование их биологической активности»

Диссертационная работа «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis* и исследование их биологической активности» выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России) в лаборатории генной инженерии. В период подготовки диссертационной работы Харлампиева Д.Д. выполняла обязанности младшего научного сотрудника.

Харлампиева Д.Д. в 2006 г. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет

имени М.В. Ломоносова» по специальности «Биохимия». С октября 2009 г. Харлампиева Д.Д. работает в лаборатории генной инженерии Федерального государственного учреждения «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства (ФГУ «НИИ ФХМ» ФМБА России) в должности младшего научного сотрудника. В октябре 2010 г. поступила в очную аспирантуру ФГУ «НИИ ФХМ» ФМБА России, с декабря 2011 г. по сентябрь 2013 г. продолжила обучение в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России). После окончания аспирантуры Харлампиева Д.Д. продолжила работать в должности младшего научного сотрудника в лаборатории генной инженерии ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России, с октября 2015 г. – ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России.

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в декабре 2015 г. в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства».

Тема диссертационной работы утверждена на заседании Учёного совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (Протокол № 7 от 26 сентября 2013 г.).

Научный руководитель:

Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России.

Подготовленная диссертационная работа была представлена 01 декабря 2015 г. на расширенном межлабораторном заседании Отдела молекулярной биологии и генетики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность темы и направленность исследования.

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*. 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. 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. Показано, что некоторые изоляты *B. fragilis* вызывают накопление жидкости в перевязанных петлях кишечника овец и телят. Штаммы *B. fragilis*, вызывающие такое накопление, получили название энтеротоксигенных (ETBF), а штаммы, не имеющие такого свойства – неэнтеротоксигенными (NTBF). В дальнейшем было показано, что ETBF, в отличие от NTBF, секрецируют белок, который получил название фрагилизин или BFT (*Bacteroides fragilis* toxin).

BFT – это секретируемый белок, кодируемый геном, входящим в состав островка патогенности в геноме *B. fragilis*. BFT синтезируется в виде препробелка. В процессе созревания от него отщепляется сигнальный пептид и N-концевой домен. С-концевой домен (катализический домен) является зрелой формой BFT. Катализический домен содержит мотив HEXXHXXXGXXH, характерный для металлопротеиназ клана метцинкина. 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 катализическом домене.

Было показано, что BFT вызывает накопление жидкости в перевязанных петлях кишечника, а также повреждения кишечника, нейтрофильное воспаление, и, в ряде случаев, некроз и геморрагию. Главной причиной этого считается BFT-индуцируемое разрушение Е-кадгерина – белка, обеспечивающего межклеточную адгезию. Утрата Е-кадгерина приводит к разрушению плотных контактов между колоноцитами, и, как следствие, к нарушению барьера функции, и может способствовать выходу жидкости в просвет кишечника. Кроме того, повышение проницаемости эпителия может способствовать развитию воспаления слизистой. Показано, что расщепление Е-кадгерина под действием второй изоформы BFT способствует высвобождению β-катенина. Перемещение β-катенина в ядро, в свою очередь, приводит к синтезуprotoонкогена C-мус и затем к усилению пролиферации клеток. Таким образом, имеются данные, свидетельствующие о роли BFT-индуцированного расщепления Е-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 Е-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.

Конкретное личное участие автора в получении научных результатов.

Все экспериментальные результаты получены либо автором самостоятельно, либо при его непосредственном участии, включая анализ литературных данных, планирование и проведение экспериментов, а также обработку, оформление результатов и написание статей.

Обсуждение и интерпретация некоторых экспериментальных данных, формулировка основных положений диссертации, составляющих ее новизну и практическую значимость, формирование цели, задач, выводов и обсуждение результатов проводилось совместно с научным руководителем.

Степень достоверности результатов проведенных соискателем ученой степени исследований.

Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Представлен большой экспериментальный материал. Полученные результаты сравнивались с результатами отечественных и зарубежных исследователей в сходном направлении. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Новизна и ценность результатов, полученных лично автором в ходе научного исследования.

В настоящее время считается, что Е-кадгерин является субстратом для BFT. Это оправдано ввиду того, что BFT содержит мотив, характерный для металлопротеиназ, и, следовательно, может обладать протеолитической активностью, а Е-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. Однако нет исследований, в которых было бы строго продемонстрировано непосредственное расщепление очищенного Е-кадгерина под воздействием BFT.

В ходе данной работы впервые получены 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*). Показано, что зрелые рекомбинантные BFT вызывают изменение морфологии клеток линии HT-29, а также приводят к расщеплению Е-кадгерина в интактных клетках этой линии. Такая же активность описана в литературе для BFT, выделенного из культуральной жидкости *B. fragilis*. Продемонстрировано, что вопреки имеющимся в литературе данным, BFT не расщепляет такие субстраты, как желатин, азоколл и азоказеин.

В данной работе получены рекомбинантные Е-кадгерины в бактериях *E. coli* и клетках человека линии Expi293F (линия клеток, полученных из эмбриональной почки человека, характеризующаяся высоким выходом рекомбинантных белков). Также выделена фракция, обогащенная Е-кадгерином, из клеток линии adenокарциномы толстого кишечника человека HT-29. Не было выявлено расщепления очищенного Е-кадгерина при инкубации с BFT *in vitro*, расщепление Е-кадгерина происходило только при воздействии BFT на интактные клетки человека. Таким образом, по результатам проведенных экспериментов, BFT расщепляет Е-кадгерин не напрямую, как это предполагалось ранее, а более сложным путем, пока неизвестным.

Для выявления потенциальных субстратов для ВФТ с помощью tandemной хромато-масс спектрометрии были проанализированы белки, высвобождающиеся в культуральную среду после обработки ВФТ клеток линии НТ-29. Среди них был обнаружен не только Е-кадгерин, но и ряд других белков, которые впервые были идентифицированы в данной 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 ВФТ требуют пересмотра и уточнения в ходе дальнейших исследований.

Практическая значимость диссертации и использование полученных результатов.

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

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите.

Представленная Харлампиевой Дарьей Дмитриевной диссертация направлена на получение и исследование биологической активности рекомбинантных фрагилизинов. Работа соответствует специальности 03.01.04 – Биохимия, по которой рекомендуется к защите.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени.

По теме диссертации опубликовано 3 статьи, отражающие основной объём диссертационной работы, в изданиях, удовлетворяющих требованиям п. 13 «Положения о присуждении учёных степеней» утверждённого Правительством РФ от 24.09.2013 г. № 842, и перечню рецензируемых журналов ВАК РФ.

Список публикаций:

1. Kharlampieva D.D., Manuvera V.A., Podgorny O.V., Kovalchuk S.I., Pobeguts O.V., Altukhov I.A., Alexeev D.G., Lazarev V.N., Govorun V.M. Purification and characterisation of recombinant *Bacteroides fragilis* toxin-2 // Biochimie. 2013. Vol. 95. No 11. P. 2123-2131.
2. Nikitina A.S., Kharlampieva D.D., Babenko V.V., Shirokov D.A., Vakhitova M.T., Manolov A.I., Shkoporov A.N., Taraskina A.E., Manuvera V.A., Lazarev V.N., Kostryukova E.S. Complete Genome Sequence of an Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Clinical Isolate // Genome Announc. 2015. Vol. 3. No 3. pii: e00450-15.
3. Kharlampieva D., Manuvera V., Podgorny O., Grafskaya E., Kovalchuk S., Pobeguts O., Altukhov I., Govorun V., Lazarev V. Recombinant fragilysin isoforms cause E-cadherin cleavage of intact cells and do not cleave isolated E-cadherin // Microbial Pathogenesis. 2015. Vol. 83-84. P. 47-56.

Результаты работы представлены также на пяти конференциях и опубликованы в соответствующих сборниках тезисов.

Считать диссертационную работу Харлампиевой Д.Д. «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis* и исследование их биологической активности» законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует критериям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном Правительством РФ от 24.09.2013 №842.

Диссертационная работа Харлампиевой Д.Д. «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis* и исследование их биологической активности» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Заключение принято на расширенном межлабораторном заседании Отдела молекулярной биологии и генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» путем открытого голосования. Присутствовало на семинаре 40 человек, «за» - 39 человек, «против» - 0 человек, «воздержалось» - 1 человек. Протокол №1 от 01 декабря 2015 г.

Председатель расширенного
межлабораторного заседания Отдела
молекулярной биологии и генетики
заместитель генерального директора по
научной работе, д.б.н., профессор РАН



Ильина Е.Н.

Секретарь расширенного
межлабораторного заседания Отдела
молекулярной биологии и генетики
заведующий лабораторией постгеномных
исследований в биологии
к.б.н.



Кострюкова Е.С.