

На правах рукописи

ХАРЛАМПИЕВА ДАРЬЯ ДМИТРИЕВНА

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

Специальность 03.01.04 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», в лаборатории генной инженерии.

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Лазарев Василий Николаевич

Официальные оппоненты: **Соколов Николай Николаевич**
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», заведующий лабораторией медицинской биотехнологии

Гурина Ольга Ивановна
доктор медицинских наук,
федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель лаборатории нейрохимии Отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2016 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Орловский А.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 НЕХХНХХGХХН, характерный для металлопротеиназ клана метцинкина (Bode *et al.*, 1993, Moncrief *et al.*, 1995). Были обнаружены три изоформы ВФТ (ВФТ-1, ВФТ-2 и ВФТ-3) с различиями в аминокислотной последовательности от двух до пяти аминокислотных остатков в продоме 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 ВФТ 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 ВФТ-индуцируемое разрушение Е-кадгерина – белка, обеспечивающего межклеточную адгезию. Утрата Е-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 VFT 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 VFT-индуцированного расщепления E-кадгерина в развитии воспаления слизистой кишечника и колоректального рака. До настоящего времени не было опубликовано работ, в которых все три изоформы VFT 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 VFT, в том числе выявление природного субстрата для VFT, представляется актуальной задачей.

Цель работы: изучение биологической активности рекомбинантных VFT трех изоформ.

Задачи:

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

Научная новизна.

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

В ходе работы мы впервые получили все три описанные в литературе изоформы VFT в гетерологичной системе экспрессии *E. coli* (в литературе имеются данные только про получение VFT-3 в *E.coli*). Мы показали, что зрелые рекомбинантные VFT 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 VFT, 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-кадгерином, 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 НТ-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.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц и 32 рисунка. Состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», который включает 144 источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Получение рекомбинантных ВФТ трех изоформ

Для выявления ДНК *B. fragilis* токсигенных штаммов был проведен скрининг 134 образцов ДНК из кала человека. Образцы ДНК 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, Россия, образцы получены в рамках проекта «Метагеном кишечника человека»). Последовательности ДНК, кодирующие ВФТ, были обнаружены в 18 образцах. После секвенирования амплифицированных фрагментов было выявлено, что восемь образцов содержат ДНК *B. fragilis*, кодирующую фрагилизин изоформы 1, восемь – изоформы 2, и два образца – изоформы 3. Далее эти образцы были использованы для амплификации целевых фрагментов ДНК. 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 (mBFT). Исходя из этого, мы амплифицировали последовательности ДНК, соответствующие как только каталитическому домену ВФТ, так и обоим доменам. Полученные фрагменты ДНК клонировали в плаزمиды pET-15b или pBAD/GIII, обеспечивающих эффективную экспрессию рекомбинантных генов в *E. coli*. Карты полученных плазмид представлены на рисунке 1.

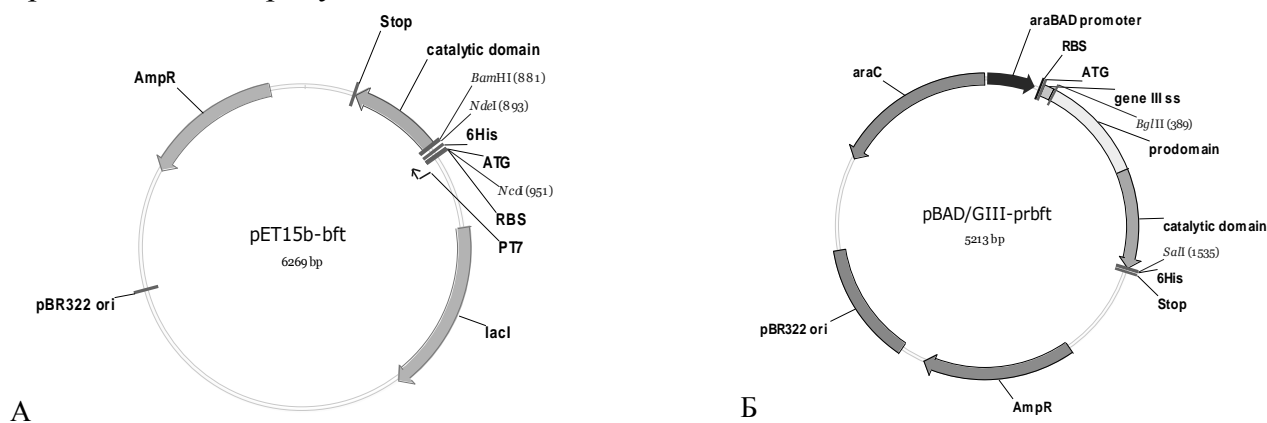


Рисунок 1. Карты плазмид pET15b-bft (А) и pBAD/GIII-prBFT (Б). araBAD promoter – araBAD промотор *E.coli*; RBS – сайт связывания рибосомы; gene III ss – последовательность, кодирующая сигнальный пептид белка GIII бактериофага fd; prodomain и catalytic domain – последовательности, кодирующие продомен и каталитический домен ВФТ, 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.

Полученные плазмиды были использованы для наработки белков в *E. coli*. Мы получили штаммы-продуценты *E. coli*, синтезирующие каталитический домен BFT-2 (BFT2-CD) и полноразмерные BFT (prBFT-His – белок, состоящий из продомена и каталитического домена, слитый с последовательностью из шести остатков гистидина; prBFT-min – аналогичный белок, без гексагистидиновой последовательности. Для получения prBFT-min перед последовательностью, кодирующей шесть остатков гистидина, вводился стоп-кодон). 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. Ранее *in vivo* было показано, 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 всех рекомбинантных prBFT, растворенных в PBS, в течение суток при +37°C или до нескольких недель при +4°C не приводило к детектируемому автопротеолитическому расщеплению данных белков.

Известно, что при созревании пробелка происходит его расщепление в положении 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 активного BFT путем ограниченного трипсинолиза пробелка. При высоких концентрациях трипсина или длительном инкубировании наблюдалось полное расщепление prBFT (рисунок 2, 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 BFT (20 кДа) (рисунок 2, дорожка 3). В случае более низких концентраций трипсина происходил частичный гидролиз с образованием ряда промежуточных форм (рисунок 2, дорожка 2).

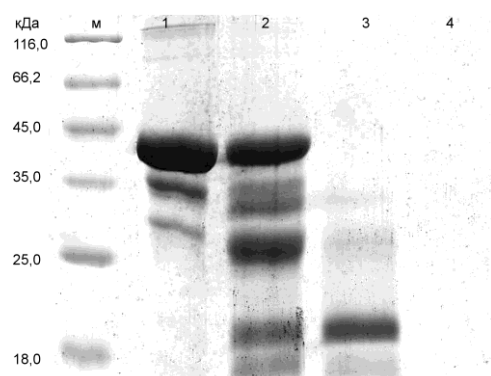


Рисунок 2. Электрофореграмма разделения в полиакриамидном геле по Лэмбли продуктов ограниченного трипсинолиза prBFT2-His в течение 1 ч при 37°C. 1 – исходный образец рекомбинантного prBFT2-His; 2, 3, 4 – prBFT2-His после инкубации с 1, 10, 100 мкг/мл трипсина, соответственно. Для остальных изоформ процесс ограниченного трипсинолиза проходил аналогично. Окраска 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*. Рекомбинантные BFT, полученные в ходе данной работы, приведены в таблице 1.

Таблица 1.

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 | + | + |
| 4. | mBFT3-His | 3 | Аналогично №2 | + | + |
| 5. | mBFT1-min | 1 | Аналогично №2 | - | + |
| 6. | mBFT2-min | 2 | Аналогично №2 | - | + |
| 7. | mBFT3-min | 3 | Аналогично №2 | - | + |

В названиях белков использованы следующие сокращения: CD – каталитический домен BFT, mBFT – зрелый BFT, полученный путем ограниченного трипсинолиза из пробелка, mBFT-His – зрелый BFT, слитый с последовательностью из шести остатков гистидина, mBFT-min - зрелый BFT без последовательности из шести остатков гистидина.

На рисунке 3 приведены схематичные изображения рекомбинантных BFT, полученных в гетерологической системе *E. coli* в нашей работе.

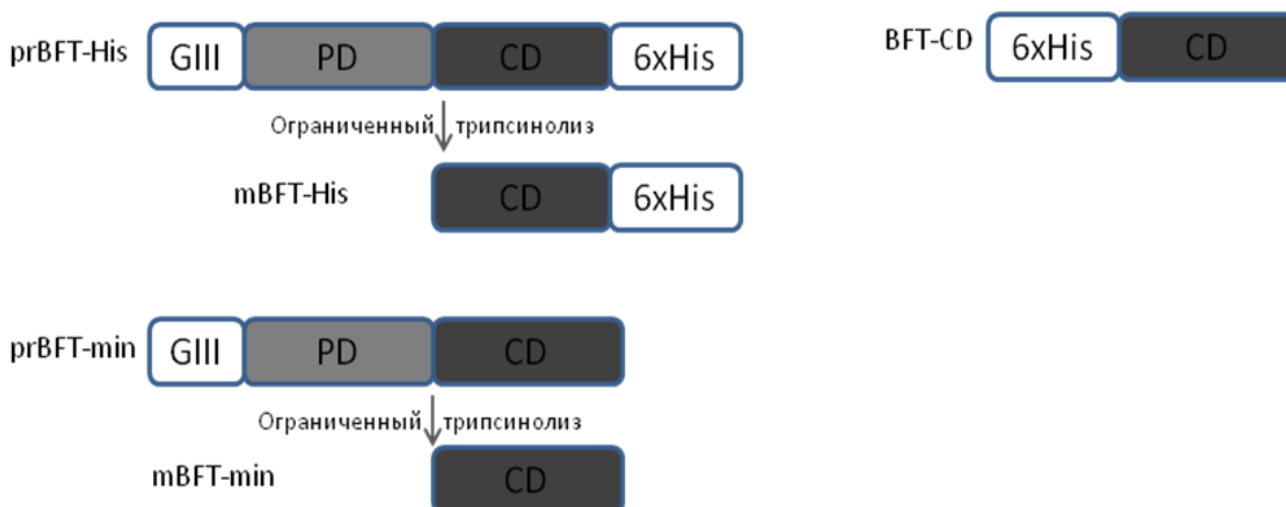


Рисунок 3. Схемы рекомбинантных BFT, полученных в гетерологической системе *E. coli* в нашей работе. GIII – сигнальный пептид белка GIII бактериофага fd; PD – продомен BFT; CD – каталитический домен BFT, 6xHis – последовательность из шести остатков гистидина.

В процессе оптимизации выделения рекомбинантных зрелых BFT мы исключили стадию очистки прBFT из солюбилизованных телец включения с помощью метал-хелатной хроматографии. Рекомбинантный прBFT составлял около 90% всех белков телец включения, поэтому мы подвергали ограниченному трипсинолизу неочищенный белок из растворенных в 8М мочеvine телец включения и в дальнейшем выделяли зрелый BFT 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.

До настоящего времени, по литературным данным, в гетерологической системе *E. coli* был получен только BFT-3. При этом в исследовании (Shiryaev *et al.*, 2013) 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. В другом исследовании (Goulas *et al.*, 2011) авторы 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.

При работе с mBFT2-His мы обратили внимание, что элюция с метал-хелатного сорбента с использованием имидазола идет неполно. Элюция с применением EDTA оказалась эффективнее, полностью освобождая сорбент от белка. Мы предположили, что BFT способен связываться с метал-хелатным сорбентом даже в отсутствие последовательности из шести остатков гистидина. Это предположение подтвердилось при выделении mBFT1-min, mBFT2-min и mBFT3-min (белки №№ 5-7 в таблице 1). Мы показали, что с Ni-сефарозой эффективно связываются как проформа BFT, так и зрелый белок без гексагистидиновой последовательности, причем при концентрации соли, исключающей связывание за счет обычных электростатических взаимодействий. 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 связывать метал-хелатный сорбент. Таким образом, мы исключили участие цинк-связывающего мотива BFT в связывании с сорбентом.

Действие выделенных рекомбинантных BFT на клетки линии HT-29

Активность выделенных рекомбинантных BFT оценивали по методу Weikel C.S. (Weikel *et al.*, 1992), а именно по изменению морфологии (округлению) клеток линии аденокарциномы толстого кишечника человека HT-29, а также по расщеплению E-кадгерина клеток данной линии (Wu *et al.*, 1998) после обработки BFT.

Мы показали, что обработка зрелыми BFT (mBFT) всех трех изоформ вызывает изменение морфологии клеток линии HT-29, которые приобретают ярко выраженную шарообразную форму (рисунок 4). Однако, воздействие на те же клетки проформы BFT (prBFT, состоит из продомена и каталитического домена) (рисунок 4) или рекомбинантного каталитического домена BFT (BFT2-CD) не приводит ни к каким значимым изменениям в морфологии.

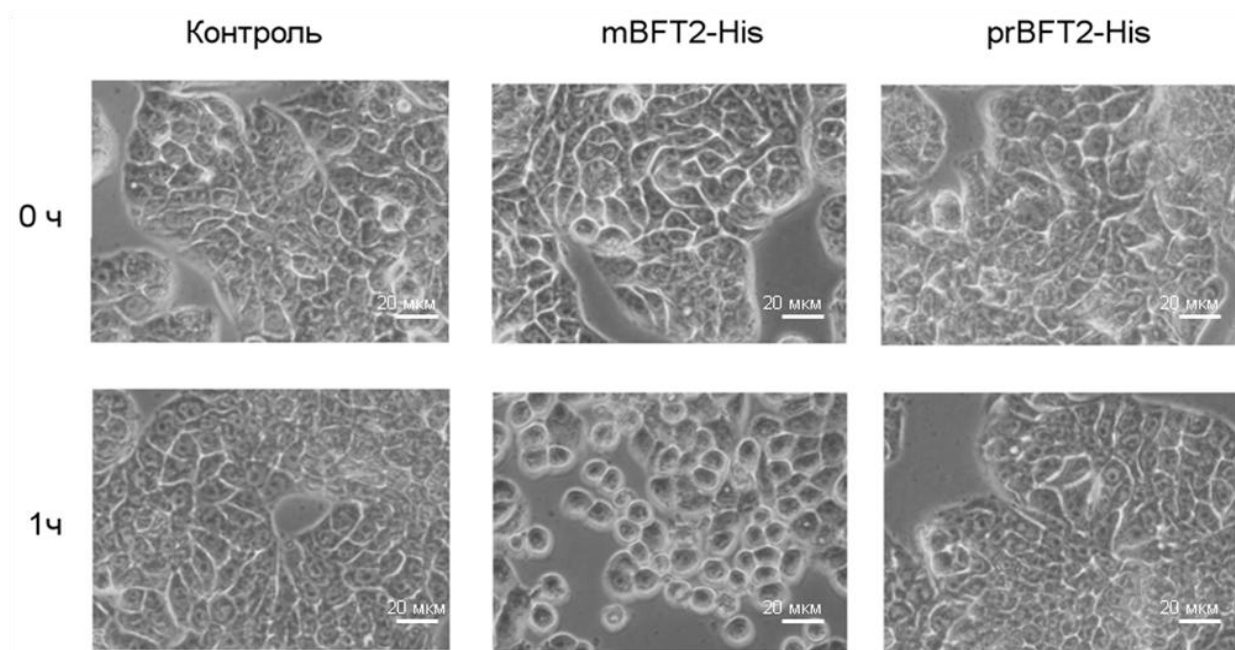


Рисунок 4. Изменение морфологии клеток линии HT-29 после обработки mBFT2-His (2 мкг/мл) и prBFT2-His (5 мкг/мл). В контрольные образцы вместо раствора BFT был добавлен PBS. Снимки получены с использованием Olympus Live Cell Imaging System (Olympus, Япония). Изменения морфологии клеток HT-29 после обработки mBFT1-His, mBFT3-His, mBFT1-min, mBFT2-min, mBFT3-min были такими же, как для mBFT2-His.

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 5) или BFT2-CD расщепления E-кадгерина не наблюдается.

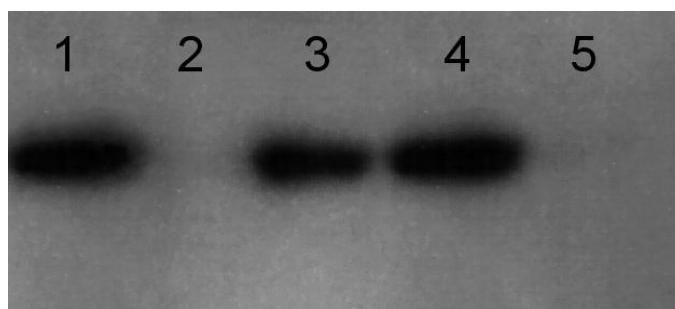


Рисунок 5. Вестерн-блот гибридизация с антителами к E-кадгерину лизатов клеток HT-29 после инкубации с рекомбинантными BFT-2 (зрелым белком и пробелком). Лизат культуры клеток HT-29 после обработки в течение 1 ч: 1 – контроль, PBS; 2 – mBFT2-His (10 мкг/мл); 3 – prBFT2-His (20 мкг/мл); 4 – mBFT2-His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

На основании этих данных мы предположили, что полученный BFT2-CD в процессе ренатурации не принимает нативную конформацию. Возможно, что N-концевой домен BFT-2 участвует в процессе образования пространственной структуры, т.е. служит внутримолекулярным шапероном для каталитического домена, как это было показано для BFT-3 (Goulas *et al.*, 2011). Кроме того, N-концевой домен блокирует каталитическую активность С-концевого домена.

Показано также, что добавление фенилметилсульфонилфторида (PMSF, ингибитор сериновых протеиназ) не препятствовало расщеплению Е-кадгерина, в то время как 5 мМ EDTA (ингибитор металлопротеиназ, хелатирует двухвалентные катионы) ингибирует этот процесс. Поскольку BFT имеет в составе цинк-связывающий мотив, характерный для металлопротеиназ клана метцинкина, эти данные согласуются с представлением о том, что Е-кадгерин может являться субстратом для BFT.

Тестирование протеолитической активности рекомбинантных BFT использованием желатина и хромогенных субстратов

Далее мы решили охарактеризовать протеолитическую активность полученных рекомбинантных mBFT, используя ряд ранее описанных субстратов. Согласно литературным данным, изоформа 1 расщепляет желатин и азоколл, а изоформа 3 – азоказеин и азоколл. 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 1), 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 Е-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 Tassel *et al.*, 1992). Чтобы исключить предположение о неправильной укладке целевого белка, мы получили prBFT-2, который накапливался в растворимой фракции *E.coli*. Мы очистили этот белок и далее получили его зрелую форму (mBFT2-His-Sol). Мы выявили, что mBFT2-His-Sol вызывает изменение морфологии клеток HT-29 и индуцирует расщепление Е-кадгерина в клетках этой линии, так же как и mBFT2-His, полученный путем ограниченного трипсинолиза prBFT2-His, ренатурированного из телец включения. В то же время mBFT2-His-Sol не расщепляет азоколл и желатин. Таким образом, его свойства не отличаются от свойств ренатурированного белка, по крайней мере, на

качественном уровне. Однако следует отметить, что prBFT2-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 тельц 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 тельц 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 prBFT из тельц 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.

Тестирование протеолитической активности рекомбинантных BFT с использованием модифицированного тиоредоксина

Ранее Shiryaev S.A. с соавторами (Shiryaev *et al.*, 2013) использовали комбинаторную библиотеку пептидов и выявили характерный мотив для расщепления BFT-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 BFT. Этот белок затем использовали для определения активности BFT. 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, и расщепления модифицированных тиоредоксинов детектировано не было. Возможное объяснение данного факта заключается в том, что

структура субстрата, помимо непосредственно сайта протеолиза, также важна для его узнавания BFT и последующего расщепления.

Исследование E-кадгерина в качестве потенциального субстрата для BFT

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 белками BFT-1, BFT-2, BFT-3 наблюдается расщепление E-кадгерина, можно предположить, что BFT – протеиназа, субстратом которой является E-кадгерин. Однако в процессе работы мы получили данные, позволяющие поставить под сомнение это заключение. Мы выявили, что рекомбинантные зрелые немутантные BFT не расщепляют рекомбинантный E-кадгерин, выделенный из *E. coli*. 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 получили рекомбинантный E-кадгерин в клетках 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. При этом обработка интактных клеток линии HT-29 этими же препаратами BFT приводила к расщеплению E-кадгерина. Полученные данные свидетельствуют о том, что механизм гидролиза E-кадгерина под действием BFT сложнее, чем прямое расщепление полипептида протеиназой.

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 HT-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. Такие белки не проявляли активности в отношении клеток линии HT-29. Таким образом, для проявления биологической активности BFT важна нативная структура активного центра, характерного для металлопротеиназ. В то же время зрелые рекомбинантные немутантные 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.

Выявление белков, высвобождающихся в культуральную среду после обработки клеток HT-29 белком 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.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/complete/). 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). Для наглядного представления изменений в содержании белков в культуральной среде после обработки клеток линии HT-29 белком mBFT2-His нами были построены тепловые карты (рисунок 6).

Как видно из рисунка 6, 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).

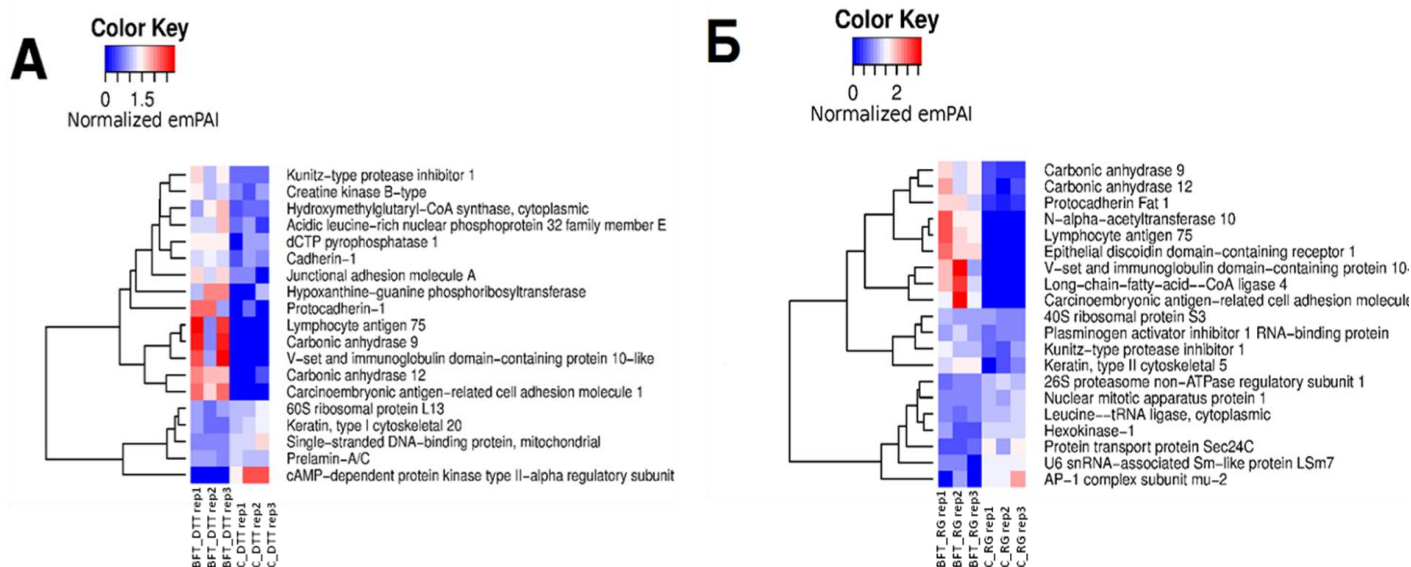


Рисунок 6. Анализ содержания белков в культуральной среде после обработки клеток HT-29 mBFT2-His. emPAI - Exponentially Modified Protein Abundance Index, индекс представленности белка, С – контроль, ВFT – опыт, rep1 – первый биологический повтор, rep2 – второй биологический повтор, rep3 – третий биологический повтор. А – тепловая карта (способ проподготовки с DTT), Б – тепловая карта (способ проподготовки с RapiGest и DTT).

Таким образом, мы впервые идентифицировали белки, высвобождающиеся в культуральную среду после обработки клеток HT-29 ВFT. Среди них обнаружены внеклеточные фрагменты мембранных белков. В литературе протеиназы, вызывающие отщепление (или «шеддинг») внеклеточных доменов интегральных мембранных белков или белков, закрепленных на мембране с помощью гликозилфосфатидилинозитольного якоря, объединены под названием «шеддазы». Одними из представителей «шеддаз» являются протеиназы семейства ADAMs. В работе (Goulas *et al.*, 2011) был проведен рентгеноструктурный анализ prBFT-3 и установлено, что его каталитический домен имеет значительное сходство по структуре с членами семейства ADAMs. Согласно полученным нами данным, ВFT 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 6, таблица 2)). Функции этих белков приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Функции мембранных белков, внеклеточные фрагменты которых высвобождаются в культуральную жидкость после обработки клеток HT-29 mBFG2-His.

| № | Swiss-Prot acc. | Название | Функции |
|---|-----------------|---|--|
| 1 | P12830 | Cadherin-1 (E-cadherin) | Образование клеточных контактов, регуляция пролиферации. Специфичен для эпителия. |
| 2 | O43570 | Carbonic anhydrase-12 | Регуляция pH. Описана мутация, приводящая к избыточному потоотделению с увеличенным количеством выводимых хлоридов. Участие в регулировании пролиферации клеток. |
| 3 | Q16790 | Carbonic anhydrase-9 | Регуляция pH. Возможно участие в регулировании пролиферации и трансформации. |
| 4 | Q14517 | Protocadherin Fat-1 | Участие в образовании контактов между клетками, регуляция пролиферации клеток. |
| 5 | Q08174 | Protocadherin-1 | Участие в образовании контактов между клетками. В эпителии бронхов колокализуется с E-кадгерином. Снижение синтеза protocadherin-1 приводит к разрушению промежуточных и плотных контактов между клетками. |
| 6 | O60449 | Lymphocyte antigen-75 | Экспрессируется в селезенке, тимусе, кишечнике и периферических лимфоцитах. Участвует в процессинге антигенов. |
| 7 | Q08345 | Epithelial discoidin domain-containing receptor 1 | Участвует во взаимодействии клеток с внеклеточным матриксом, регуляции миграции и пролиферации клеток. |
| 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. |

| | | | |
|----|--------|--------------------------------|---|
| 10 | Q9Y624 | Junctional adhesion molecule A | Участвует в формировании плотных контактов между клетками эпителия. |
|----|--------|--------------------------------|---|

Таким образом, VFT можно отнести к упомянутым выше протеиназам-шеддазам.

Известно, что энтеротоксигенные штаммы *B. fragilis*, продуцирующие VFT, ассоциированы с развитием колоректального рака (Торрак *et al.*, 2006). Можно предположить, что нарушение межклеточной адгезии и пролиферации клеток способствует развитию патологий, в том числе рака. Роль других белков, высвобождаемых после обработки клеток VFT, в клеточном ответе и развитии патологических состояний остается предметом для дальнейших исследований.

Таким образом, мы выявили несколько потенциальных природных субстратов для VFT-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 Ecr1293F. 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 ETBF в организме человека.

ВЫВОДЫ

- Разработан способ получения и выделения активных рекомбинантных ВФТ изоформ 1, 2, 3, включающий в себя процессинг rgВФТ путем ограниченного трипсинолиза;
- полученные рекомбинантные ВФТ обладают такой же активностью в отношении клеток линии аденокарциномы толстого кишечника человека (HT-29), как и ВФТ из природного источника – *B. fragilis*;
- впервые показано, что рекомбинантные зрелые изоформы ВФТ не расщепляют рекомбинантный полноразмерный E-кадгерин, выделенный из *E.coli* и клеток линии Eхрi293F. Таким образом, ВФТ расщепляет E-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 работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

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., Grafaskaia 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.

Материалы конференций:

1. **Харлампиева Д.Д.**, Манувера В.А., Подгорный О.В. Клонирование и экспрессия гена *bft-2 Bacteroides fragilis* в гетерологичной системе *E.coli* // Материалы XIX Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», секция «Биология», 2012, Москва, стр. 57.
2. **Харлампиева Д.Д.**, Манувера В.А., Подгорный О.В. Выделение и очистка рекомбинантного BFT-2 *Bacteroides fragilis* // Сборник тезисов 16-й конференции молодых ученых "Биология-наука XXI века", 2012, Пущино, стр. 156.
3. **Харлампиева Д.Д.**, Манувера В.А., Подгорный О.В., Шкарупета М.М., Лазарев В.Н. Способ получения рекомбинантного фрагилизина-2 // Сборник тезисов III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», 2012, Казань, стр.186-187.
4. **Харлампиева Д.Д.**, Манувера В.А., Подгорный О.В., Шкарупета М.М. Выделение, очистка и характеристика рекомбинантного фрагилизина-2 *Bacteroides fragilis* // Тезисы конференции молодых ученых «Молекулярная медицина и постгеномная биология», Эфферентная и физико-химическая медицина, № 2, 2012, стр.71.
5. **Kharlampieva D.**, Manuvera V., Podgorny O., Grafaskaia E., Kovalchuk S., Pobeguts O., Altukhov I., Alexeev D., Lazarev V. Fragilysin as a sheddase: identification of released proteins // The FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, FEBS Journal, Vol. 281 (Suppl. 1), 2014, p.742.

Список сокращений

ПААГ – полиакриламидный гель

BFT – токсин *Bacteroides fragilis*

CD – каталитический домен

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

ETBF – энтеротоксигенный штамм *B. fragilis*

emPAI – экспоненциально модифицированный индекс представленности белка

mBFT – зрелый BFT, полученный путем ограниченного трипсинолиза из пробелка

NTBF – неэнтеротоксигенный штамм *B. fragilis*

PAI – индекс представленности белка

PD – продомен

RMSF – фенилметилсульфонилфторид

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