

На правах рукописи

Веселовский Владимир Александрович

**Влияние цитокинов человека на комменсальные микроорганизмы на
примере лактобацилл и бифидобактерий**

Специальность 1.5.7. - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2023

Работа выполнена в лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

Научный руководитель: **Климина Ксения Михайловна**
к.б.н., заведующий лабораторией геномных исследований и вычислительной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», г. Москва.

Официальные оппоненты: **Закатаева Наталия Павловна**
д.б.н., доцент, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией АО Научно-исследовательского института «Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»), г. Москва.

Калинин Дмитрий Валерьевич
к.м.н., заведующий патолого-анатомическим отделением Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва

Защита состоится «21» декабря 2023 в __ часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, dissovet@vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

И.И. Горячева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Микроорганизмы в составе кишечной микробиоты находятся под постоянным давлением факторов иммунной системы организма хозяина, а их выживание зависит от умения быстро отвечать и адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Адаптивный потенциал микробных клеток заключается в способности реагировать на внешние и внутренние сигналы, в том числе на сигнальные молекулы иммунной системы, пептидные гормоны и нейромедиаторы, и отвечать на их воздействие (Lesouhaitier et al. 2009).

Микробиом играет решающую роль в обучении и развитии основных компонентов врожденной и адаптивной иммунной системы хозяина, в то время как иммунная система управляет поддержанием ключевых особенностей симбиоза хозяина и микробов (Zheng, et al. 2020). Бифидобактерии и лактобациллы обладают ярко выраженными иммуномодулирующими свойствами и способны инициировать воспалительный процесс в присутствии патогенов, стимулируя выработку как противовоспалительных, так и провоспалительных цитокинов и других факторов иммунного ответа (Ma et al. 2021).

Воспалительные механизмы иммунной системы хозяина, направленные на элиминирование патогенных микроорганизмов, как правило, нацелены на консервативные молекулярные структуры, обнаруживаемые как у патогенов, так и у других кишечных микробов, при этом состав нормальной кишечной микробиоты может оставаться стабильным в течение многих лет, что демонстрирует высокую устойчивость микроорганизмов к факторам иммунной системы. Однако механизмы, обеспечивающие выживание бифидобактерий, лактобацилл и других микроорганизмов в условиях воспалительного процесса, и постоянство репертуара нормальной микробиоты кишечника, остаются малоизученными. Понимание механизмов адаптации кишечных микроорганизмов, таких как *Bifidobacterium longum* и *Lactobacillus rhamnosus*, может позволить лучше понять взаимодействия организма хозяина с собственной микробиотой. В перспективе это позволит отбирать наиболее подходящие штаммы для применения в клинической практике.

Цель исследования

Изучение влияния провоспалительных и противовоспалительных цитокинов на представителей комменсальной микробиоты кишечника на примере лактобацилл и бифидобактерий.

Задачи исследования

1. Изучение профиля экспрессии генов штамма *B. longum* GT15 на разных стадиях роста.
2. Оценка влияния цитокинов TNF α и IL-6 на рост штамма *B. longum* GT15, а также TNF α , IL-6, IL-8 и IL-10 на рост штамма *L. rhamnosus* K32.

3. Транскриптомный анализ штаммов *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32, культивированных с добавлением в среду цитокинов, поиск дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) и их функциональная аннотация.

4. Определение эволюционно стабильных групп генов и анализ оперонной организации ДЭГ.

5. Анализ полученных данных и предсказание механизмов адаптации штаммов *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32 к воздействию цитокинов.

Научная новизна работы

В рамках данной работы впервые изучены механизмы адаптации культур бифидобактерий и лактобацилл, в частности, штаммов *Bifidobacterium longum* GT15 и *Lactocaseibacillus rhamnosus* K32 к присутствию в среде цитокинов TNF α , IL-6, IL-8 и IL-10 как предполагаемых активаторов путей, обеспечивающих адаптацию комменсальных микроорганизмов. Впервые изучены транскрипционные профили штаммов, описаны характерные особенности воздействия на них цитокинов. На основе данных филогенетического профайлинга и транскриптомного анализа впервые проведено предсказание генных путей штамма *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32, участвующих в формировании устойчивости к факторам иммунного ответа в условиях воспалительного процесса.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данная работа представляет новый взгляд на взаимоотношение организма хозяина и его микробиоты. Ранее микробиоту и ее отдельных представителей рассматривали как возможных создателей сигналов для изменений в организме хозяина, активации его иммунной системы. У микробиоты рассматривали преимущественно ответы на прямые раздражители, такие как температура, pH и другие активные химические соединения. Результаты, полученные в рамках данной работы, говорят о том, что между в результате совместной коэволюции организма хозяина и его микробиоты появились двусторонние системы передачи сигналов, один из которых являются короткие пептидные последовательности – цитокины. Цитокины, сигнализирующие о воспалительных процессах, влияют на микробиоту давая ей возможность адаптироваться к предстоящему иммунному ответу, что может обеспечивать ее выживание. Точное понимание механизмов, обеспечивающих адаптацию представителей кишечной микробиоты к факторам иммунного ответа в условиях воспалительного процесса, позволит отбирать штаммы, эффективно выживающие в условиях воспаления для целевого применения. Отобранные штаммы впоследствии могут быть использованы для создания лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний кишечника, сопряженных с воспалительным процессом, а также для разработки антимикробных агентов для лечения бактериальных инфекций с учетом данных о механизмах устойчивости для обеспечения лучшей выживаемости полезных для человека кишечных микробов.

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к исследованию популяционной структуры представителей микобактерий туберкулезного комплекса. Анализ научной литературы, относящейся к тематике исследования, проведен формально-логическими методами. Исследования, направленные на решение поставленных задач, осуществлялись общенаучными и специфическими методами. В работе использованы микробиологические, молекулярно-генетические, биоинформационные и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту

1. В экспоненциальной фазе роста штамма *B. longum* GT15 преимущественно активизируются гены связанные с быстрым ростом культуры, а в стационарной активируются гены, связанные с защитными функциями.
2. Культивирование штамма *B. longum* GT15 с цитокином TNF α приводит к значительным перестройкам метаболических путей штамма, и изменением экспрессии генов относящихся к защитным функциям бактериальных клеток во время воспалительного процесса.
3. Влияние цитокинов TNF α , IL-6, IL-8, IL-10 на характер экспрессии генов штамма *L. rhamnosus* K32 не является дозозависимым.
4. Цитокин IL-10 активирует фосфотрансферазную систему транспорта сахаров в штамме *L. rhamnosus* K32.

Личный вклад автора

Автор принимал личное участие на всех этапах выполнения работы: в планировании и осуществлении экспериментов, оценке и интерпретации их результатов. В процессе исследования непосредственно автором осуществлялось выделение РНК; приготовление транскриптомных библиотек, оптимизация протокола приготовления библиотек точек старта транскрипции (ТСТ) и приготовление библиотек ТСТ; секвенирование, обсчет транскриптомных данных, анализ метаболических путей и функциональная аннотация белков.

Апробация результатов работы

Результаты проведенных исследований были представлены на международных и российских конференциях, в том числе: на международной научной конференции по пробиотикам (IPC2020); на 13-ой международной мультиконференции «Биоинформатика Геномной Регуляции и Структурной/Системной Биологии» (BGRS/SB-2022); на научной конференции молодых ученых ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; на Первом Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии (РКММИ).

Публикации

Автором опубликованы 3 печатных работ по теме диссертационной работы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, а также заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста, включает 6 таблиц, 18 рисунков и 9 приложений. Список цитируемых литературных источников включает 207 наименований.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность:

Научному руководителю к.б.н., заведующей лабораторией геномных исследований и вычислительной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ИМ. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Климиной Ксении Михайловне;

Коллективу лаборатории генетики микроорганизмов Института Общей Генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии Наук

Лаборатории геномных исследований и вычислительной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ИМ. Ю.М. Лопухина ФМБА России, в частности Олехновичу Евгению Ивановичу, Шитикову Егору Александровичу, Захаревич Наталье Владимировне, Ларину Андрею Константиновичу;

Г.н.с. ФБУН НИИ СБМ Роспотребнадзора член-корр. РАН д.б.н. Ильиной Елене Николаевной;

Заведующему лабораторией функциональной геномики института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук к.б.н., доценту Сергею Александровичу Брускину.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В разделе «Обзор литературы» изложены литературные данные о микробиоте кишечника человека; влияние микробиоты на иммунную систему кишечника; компонентах кишечной иммунной системы; провоспалительных и противовоспалительных цитокинах; адаптации кишечной микробиоты к факторам иммунного ответа; бифидобактериях и лактобациллах и транскриптомных исследованиях по ним.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования

В работе использовали штамм бифидобактерий *B. longum subsp. longum* GT15 (CP006741) и штамм лактобацилл *L. rhamnosus* K32 (JNNV00000000).

Культивирование штаммов *L. rhamnosus* проводили в среде *Lacticaseibacillus* MRS Broth при 37°C в анаэробных условиях, *B. longum* GT15 в среде *Lacticaseibacillus* MRS Broth, с добавлением 0,5% цистеина при 37°C в анаэробных условиях. К экспериментальным образцам добавляли водный раствор лиофилизированных рекомбинантных человеческих цитокинов IL-6, TNF α , IL-8 и IL-10 до конечной концентрации 0,1, 1 и 10 нг/мл.

Работа с РНК

Клетки культуры штаммов собирали в середине экспоненциальной фазы (OD₆₀₀~1,2), в экспериментальных и контрольных условиях. Клетки обрабатывали RNA Protect Bacteria Reagent (QIAGEN, США) для стабилизации РНК. Выделение и очистку тотальной РНК проводили с помощью набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США). Остаточную геномную ДНК удаляли при помощи наборов TURBO DNA-free Kit (Invitrogen) и RNase-Free DNase Set (QIAGEN, США). Концентрацию и качество выделенной РНК проверяли с помощью наборов Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) и Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies) соответственно.

Приготовление транскриптомных библиотек и секвенирование

Использовали 2 мкг тотальной РНК. На первом этапе удаляли рибосомальную РНК с помощью набора RiboZero rRNA Removal Kit (Bacteria) (Epicentre/Illumina, Madison, США), и далее готовили библиотеки при помощи набора NEBNext® Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB). Размер и качество библиотек оценивали при помощи Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies). Библиотеки смешивали эквимольно, и общий пул образцов разводили до конечной концентрации 12 пМ. Секвенирование проводили на высокопроизводительном секвенаторе Illumina.

Подготовка и секвенирование 5'-обогащенных библиотек для идентификации транскрипционных стартовых сайтов

Для приготовления 5'-обогащенных библиотек удаляли рибосомную РНК (рРНК) при помощи RiboMinus (Thermo Fisher Scientific). мРНК фрагментировали с помощью Zn²⁺, 5'-конец восстанавливали T4 полинуклеотидкиназой в соответствии с протоколом производителя (Thermo Fisher Scientific) и обрабатывали экзонуклеазой Terminator, а затем обрабатывали РНК 5' пирофосфогидролазой (RppH) (NEB). РНК лигировали ds-адаптерами с выступающими внутренними концами, содержащими случайную гексамерную последовательность с использованием T4 ДНК-лигазы (Thermo Fisher Scientific). Затем генерировали кДНК с использованием праймера 5'-GGCACCCGAGAGAATTCCA-3' и обратной транскриптазы Maxima H Minus (Thermo Fisher Scientific). Концентрацию библиотек измеряли с помощью набора Quant-iT DNA Assay Kit, High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific). Библиотеки смешивали эквимольно, разводили до концентрации 12 пМ и секвенировали

методом высокопроизводительного секвенирования на Illumina HiSeq 2500 с использованием наборов для парных чтений 2×100 п.н. и 5% PhiX.

Биоинформатический анализ

Статистическая обработка результатов для построения кривых роста проводилась в программе Microsoft Office Excel 2010. Контроль качества прочтений проводили с помощью FastQC v0.11.9. Объединение результатов анализа осуществлено с помощью MultiQC v1.13.dev0 (Okonechnikov, Conesa, and García-Alcalde 2016; Ewels et al. 2016). Чтения картировали на референсный геном с использованием программы HISAT2 v2.2.1 (Kim, Langmead, and Salzberg 2015). Для конвертации файлов из формата SAM в BAM и их последующей сортировки и индексирования использовали программу SAMtools v1.9 (Li et al. 2009). Контроль качества откартированных чтений проводили с помощью QualiMap v2.2.2 (Okonechnikov, Conesa, and García-Alcalde 2016). Подсчет чтений, сопоставленных с геномными аннотациями, выполняли с помощью featureCounts v.2.0.1 (Liao, Smyth, and Shi 2014). Анализ дифференциальной экспрессии генов выполняли с помощью пакета edgeR v3.36.0 для языка R v4.1.2 (Robinson, McCarthy, and Smyth 2010). Дифференциально экспрессированными генами считались гены со значением FDR меньше 0,05 и изменением уровня экспрессии более 2-х раз.

Для идентификаций точек старта транскрипции (ТСТ) контроль качества необработанных чтений проводили с помощью FASTQC v0.11.5. Адаптеры из прочтений удаляли программой Trimmomatic v0.33. Для выравнивания коротких чтений использовали Bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012). Обработка файлов формата SAM проводилась с помощью программы SAMtools v1.9. Идентификация ТСТ и последующий анализ проводились с помощью VAS-Browser (Garanina, Fisunov, and Govorun 2018) со стандартными параметрами.

Филогенетическое профилирование

Транслированные кодирующие последовательности *Bifidobacterium* и *Lactocaseibacillus*, представленные в базе данных RefSeq NCBI, использовали для поиска ортогрупп генов (ортологичные гены — это гомологичные гены филогенетически родственных организмов, разошедшихся в процессе видообразования) с помощью программы *OrthoFinder* v.2.3.7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Профиль экспрессии генов на различных стадиях роста штамма *B. longum* GT15

Для определения наиболее оптимальных временных точек для исследования влияния интерлейкинов был проведен предварительный анализ транскриптома штамма *B. longum* GT15 на трех стадиях роста (лаг-фаза, экспоненциальная, стационарная фазы). Секвенирование проводилось методом RNA-seq, для каждой фазы роста использовалось три биологических повтора. В

каждой фазе роста были посчитаны гены, которые изменяли экспрессию ($\log_2 FC \geq |1|$, $FDR < 0,05$): всего 239 ДЭГ были обнаружены в экспоненциальной фазе по сравнению с лаг-фазой, включая 141 ген с пониженной экспрессией и 98 генов с повышенной экспрессией; 553 ДЭГ были обнаружены в стационарной фазе по сравнению с лаг-фазой, среди которых 277 генов с пониженной экспрессией, а 276 генов с повышенной экспрессией; и 392 ДЭГ были обнаружены в стационарной фазе по сравнению с экспоненциальной фазой, включая 190 генов с пониженной экспрессией и 202 с повышенной экспрессией (рисунок 1).

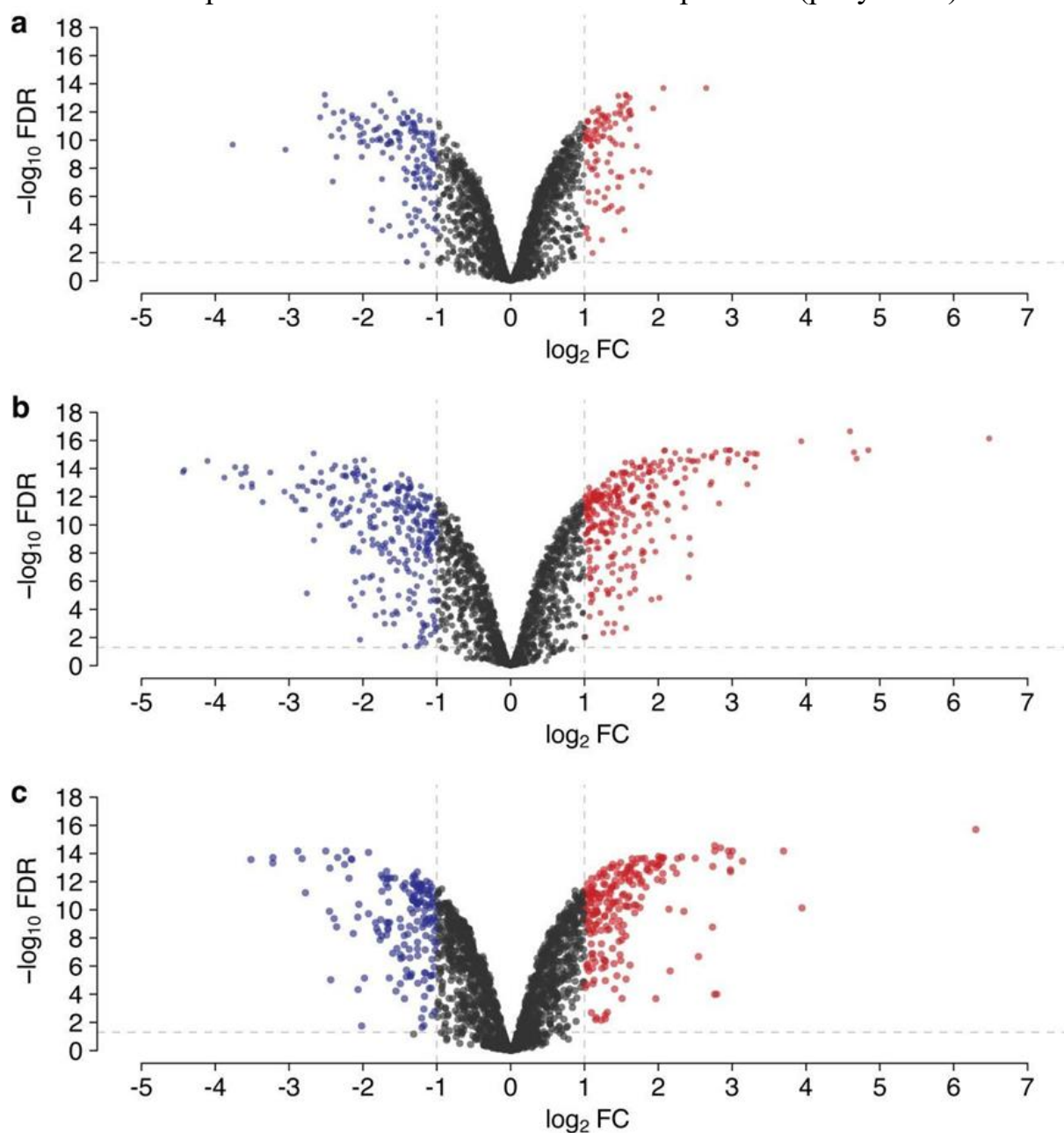


Рисунок 1 - Диаграмма, изображающая ДЭГ у *V. longum* GT15 между: (a) экспоненциальной и лаг фазой, (b) стационарной и экспоненциальной фазой, (c) стационарной и лаг-фазой.

Функциональный анализ ДЭГ между фазами роста (экспоненциальной фазой и лаг-фазой) разделил ДЭГ на 16 групп в зависимости от их функции. При сравнении стационарной и лаг-фазы и стационарной и экспоненциальной фазы на 19 групп (рисунок 2).

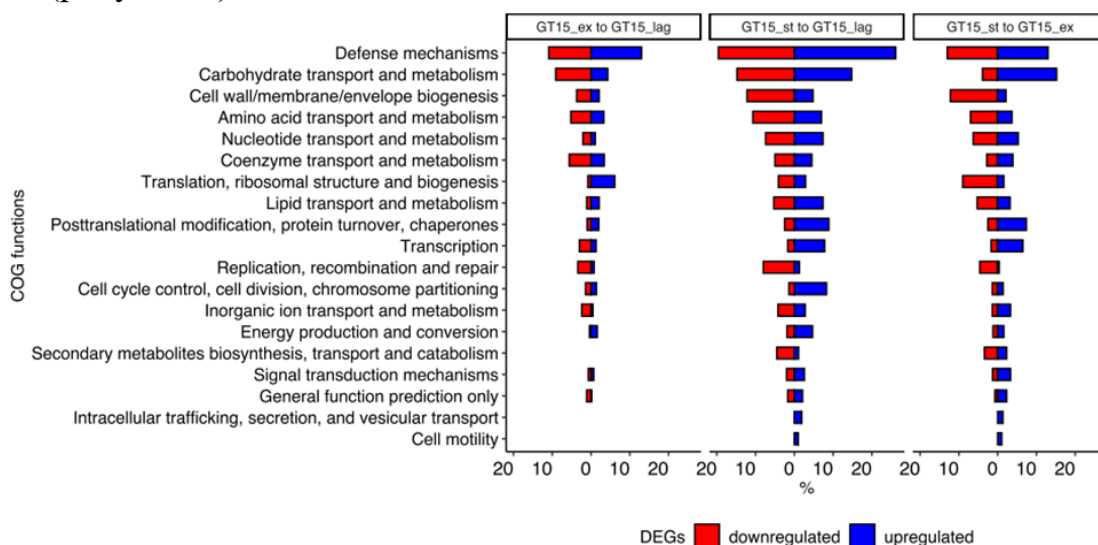


Рисунок 2 - Функциональный анализ ДЭГ на всех фазах роста

В ходе анализа было установлено, что в лаг-фазе гораздо активнее экспрессируются гены, функция которых связана с активной утилизацией субстрата. В экспоненциальной фазе по сравнению с лаг-фазой активируются гены, отвечающие за синтез аминокислот, энергетический метаболизм, а также гены, участвующие в трансляции, что способствует активному делению клеток и, как следствие, приводит к экспоненциальному росту культуры. В стационарной фазе наблюдалось снижение экспрессии генов, играющих ключевую роль в поддержании скорости деления клеток, однако повышалась экспрессия генов, участвующих в метаболических путях, связанных с защитными механизмами. Это, по-видимому, связано с активацией процессов, обеспечивающих выживание клеток в условиях недостатка питательных веществ в стационарной фазе роста.

На основании полученных результатов для дальнейшего исследования влияния цитокинов на бактериальные клетки была выбрана экспоненциальная фаза роста, в которой наиболее представлены гены, ответственные за синтез аминокислот, энергетический обмен (гликолиз/глюконеогенез и азотный обмен) и трансляцию.

Влияние цитокинов на рост штамма *B. longum* GT15

Оценка влияния провоспалительных цитокинов на рост бактериальной культуры проводилась с использованием штамма *B. longum* GT15 и цитокинов IL-6 и TNF α в концентрациях 0,1, 1 и 10 нг/мл. По результатам исследования было показано, что только присутствие IL-6 в концентрации 0,1 нг/мл в ростовой среде приводило к статистически достоверным изменениям в скорости роста культуры. Добавление в среду TNF α ни в одной из исследуемых концентраций не оказывало влияния на рост штамма *B. longum* GT15.

Различия в профилях транскрипции генов *B. longum* GT15

На основании проведенных экспериментов для дальнейшего транскриптомного анализа на экспоненциальной фазе роста были отобраны образцы штамма *B. longum* GT15 под воздействием IL-6 только в концентрации 0,1 нг/мл, так как было обнаружено статистически достоверное изменение в росте штамма, и образцы под воздействием TNF α в максимальной исследуемой концентрации 10 нг/мл.

В ходе анализа для образца *B. longum* GT15, культивируемого с IL-6, по сравнению с контрольным образцом обнаружено 130 ДЭГ, включая 68 генов с пониженной экспрессией и 62 гена с повышенной экспрессией ($FC \geq |1|$, $FDR < 0,05$). При этом под воздействием IL-6 не удалось выявить гены, изменяющие свою экспрессию более чем 2 раза. Максимальное изменение было зафиксировано для гена BLGT_RS08615 ($FC=1,95$), кодирующего циркулярно перманентный белок 2 типа АТФ-захвата. Для штамма *B. longum* GT15, культивируемого с TNF α , по сравнению с контрольным образцом было обнаружено 1017 ДЭГ, среди которых 505 генов с пониженной экспрессией и 512 генов с повышенной экспрессией ($FC \geq |1|$, $FDR < 0,05$).

При воздействии TNF α экспрессия 25 генов изменялась более чем в 2 раза. Уровень экспрессии пяти генов (BLGT_RS00625, BLGT_RS03250, BLGT_RS02975, BLGT_RS08615, BLGT_RS01135) был подтвержден методом количественной ПЦР, что говорит о достоверности полученных данных. Одним из 25 ДЭГ является BLGT_RS08205, кодирующий глюкокиназу семейства ROK. Глюкокиназы вовлечены во многие процессы: углеводный обмен (гликолиз/глюконеогенез, метаболизм галактозы, крахмала и сахарозы, аминсахаров и нуклеотидных сахаров); биосинтез других вторичных метаболитов (биосинтез стрептомицина, неомицина, канамицина и гентамицина). Среди остальных генов, семь генов (BLGT_RS08190, BLGT_RS02975, BLGT_RS01310, BLGT_RS08485, BLGT_RS02915, BLGT_RS03250, BLGT_RS04525) кодируют транспортеры, участвующие в сигнальных и клеточных процессах, два гена (BLGT_RS03890, BLGT_RS00625) вовлечены в обработку генетической информации, а гены BLGT_RS03150, BLGT_RS08190, BLGT_RS01265 и BLGT_RS08920 - в метаболизм глутатиона, мембранный транспорт, сигнальную трансдукцию и трансляцию соответственно.

Стоит отметить, что под воздействием IL-6 и TNF α были найдены 74 общих ДЭГ. Среди них 33 ДЭГ с диаметрально противоположной экспрессией. Противоположный характер изменения экспрессии говорит о том, что включаются разные механизмы штамма *B. longum* GT15 на присутствие в среде IL-6 и TNF α .

Картирование путей KEGG для ДЭГ

Биологически значимые ДЭГ для *B. longum* subsp. *longum* GT15 были проанализированы с помощью Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

Согласно полученным результатам, 34 пути изменялись под воздействием IL-6 и 87 путей изменялись под воздействием TNF α .

IL-6 индуцированные гены с повышенной экспрессией вовлечены в метаболические пути метаболизма витамина B6, метаболизма серы, метаболизма глицеролипидов, метаболизма глиоксилатов и дикарбоксилатов, а с гены с пониженной экспрессией вовлечены в метаболизм гистидина, метаболизм 2-оксокарбоновых кислот, метаболизм галактозы.

В результате воздействия TNF α активируется большая часть генов метаболических путей, связанных с метаболизмом глиоксилатов и дикарбоксилатов, окислительного фосфорилирования, биосинтеза аргенина и метаболизма пропионата, биосинтез фолатов.

В тоже время снижается экспрессия генов устойчивости к бета-лактамам, систем бактериальной секреции, гомологичной рекомбинации, репликации ДНК, метаболизма глицерофосфолипидов. Влияние снижения экспрессии генов, связанных с делением клеток, на скорость роста культуры не столь выражено возможно из-за того, что бактериальная культура росла на богатой питательной среде.

Функциональная аннотация ДЭГов

ДЭГ были сгруппированы в функциональные категории в соответствии с системой классификации Clusters of Orthologous Groups (COG) (рисунок 3)

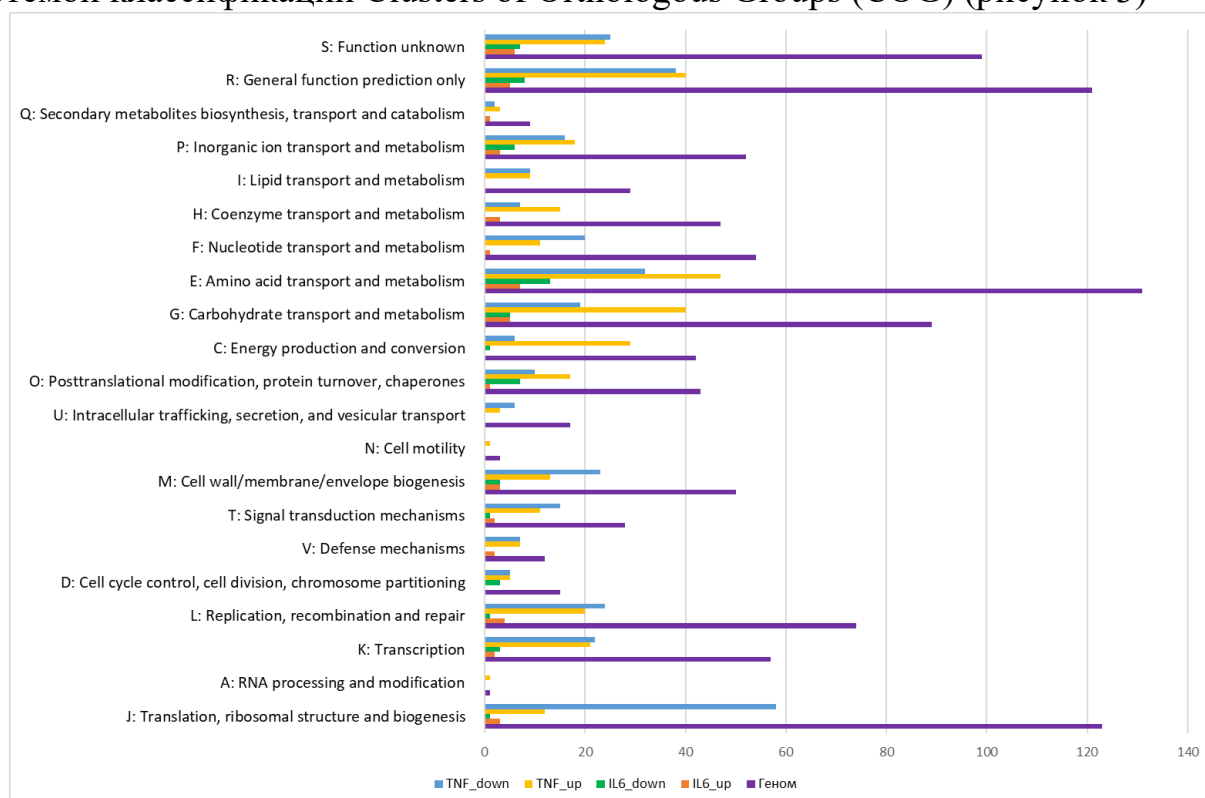


Рисунок 3 - Относительное количество транскриптов, сгруппированных в функциональные категории COG. А) Для *B. longum* subsp. *longum* GT15
Функциональная классификация ДЭГ со статистически значимой повышенной

экспрессией уровня мРНК по сравнению с контролем (желтая полоса для TNF α и оранжевая для IL-6) или пониженной экспрессии (голубая полоса для TNF α и зеленая полоса для IL-6).

COG категории H (метаболизм коферментов), E (транспорт и метаболизм аминокислот), G (транспорт и метаболизм углеводов), C (производство и преобразование энергии), O (посттрансляционная модификация, белковый обмен, шапероны) имели большое количество генов с повышенной экспрессией после культивирования с TNF α , по сравнению с контролем. Категории F (транспорт и метаболизм нуклеотидов), U (внутриклеточная транспортировка, секреция и везикулярный транспорт), M (биогенез клеточной стенки/мембраны/оболочки), T (механизмы передачи сигнала), L (репликация, рекомбинация и репарация), K (транскрипция), J (трансляция, структура и биогенез рибосом) имели высокое число генов с пониженной экспрессией после обработки TNF α по сравнению с контролем (Рисунок 5).

Гены в категориях L (репликация, рекомбинация и репарация) и H (транспорт и метаболизм коэнзимов) были с повышенной экспрессией, а гены в категориях O (посттрансляционная модификация, белковый обмен, шапероны) и E (транспорт и метаболизм аминокислот) были с пониженной экспрессией при воздействии IL-6.

Эволюционно стабильные группы генов и транскрипционная организация ДЭГ

Для выявления предполагаемых оперонов среди обнаруженных ДЭГ использовалось филогенетическое профилирование. Пары генов со сходными ФП (расстояние менее 0,001), расположенные на одной нити в пределах 10 000 нуклеотидов и имеющие одинаковый знак дифференциальной (отрицательной или положительной) экспрессии, были объединены в группы. Такие группы были обозначены как потенциальные опероны. У *B. longum* GT15 удалось предсказать для IL-6 9 потенциальных оперонных структур, а для TNF α - 176. Для *L. rhamnosus* K32 удалось предсказать 6 потенциальных оперонных структур для цитокина IL-10.

Для *B. longum* GT15 была проведена *de novo* идентификация точек старта транскрипции (ТСТ). Для этого готовились библиотеки РНК, обогащенные 5'-фрагментами мРНК. Было обнаружено 410 точек старта транскрипции. Из них 38 ТСТ принадлежали к оперонам ДЭГ после воздействия TNF α , а 7 ТСТ - к оперонам, регулирующим ДЭГ в результате воздействия IL-6.

Влияние цитокинов на рост штамм *L. rhamnosus* K32

Для проверки влияния провоспалительных (IL-6, IL-8, TNF α) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов на рост бактериальной культуры, штамм *L. rhamnosus* K32 инкубировали с различными концентрациями цитокинов, а значения OD600 измеряли в разные моменты времени. Эксперимент

показал, что присутствие IL-6, IL-8, IL-10 и TNF α в ростовой среде не приводило к изменениям в скорости роста культуры.

Различные концентрации цитокинов не влияют экспрессию генов *L. rhamnosus* K32

Для дальнейшего понимания механизма, лежащего в основе реакции лактобацилл на воспаление, провели высокопроизводительное секвенирование транскриптома штамма *L. rhamnosus* K32 в экспоненциальной фазе роста в экспериментальных и контрольных условиях, с использованием технологии Illumina, в трех независимых биологических повторах. Далее выделяли гены, у которых дифференциальная экспрессия существенно изменялась ($\log_2FC \geq |1|$, FDR < 0,05) в ответ на присутствие цитокинов. При анализе транскриптомных данных влияния IL-6 на *L. rhamnosus* K32 ДЭГ не обнаружилось. При этом для всех остальных цитокинов (TNF α , IL-8 и IL-10) было выявлено значимое количество ДЭГ, особенно под воздействием интерлейкинов IL-8 и IL-10. Стоит отметить, что воздействие цитокинов в различных концентрациях (0,1 нг/мл, 1 нг/мл и 10 нг/мл) влияет на количество ДЭГ, но не влияет на уровень их экспрессии (таблица 1).

Таблица 1 - Влияние концентрации цитокинов на экспрессионный профиль штамма *L. rhamnosus* K32 (на примере IL-10).

ID гена	Белок	Диапазон изменения		
		Концентрация цитокина в среде		
		0,1 нг/мл	1 нг/мл	10 нг/мл
LRK_09355	Белок сборки пилуса	2,05	2,01	1,97
LRK_08500	Субъединица ПА транспортера сорбита фосфотрансферазной системы (ФТС)	2,03	1,89	1,92
LRK_10280	Универсальный белок стресса UspA	1,65	1,68	1,72
LRK_01885	Белок биосинтеза железо-серного кластера	1,47	1,46	1,50
LRK_03305	Транскрипционный регулятор семейства MarR	1,42	1,43	1,42
LRK_11750	Ацетилтрансфераза	1,44	1,48	1,50
LRK_10450	2-гидроксикислота дегидрогеназа	1,40	1,43	1,39
LRK_06995	Транскрипционный регулятор семейства MerR	1,37	1,42	1,42

LRK_08485	Транспортер магния	1,33	1,30	1,30
LRK_12560	Нуклеозид-дифосфат сахарная эпимераза	1,29	1,31	1,37
LRK_10800	Рибонуклеозид-трифосфат редуктаза	-1,26	-1,28	-1,28
LRK_08360	Глицерол-3-фосфат дегидрогеназа	-1,21	-1,2	-1,24
LRK_06100	Фосфорибозиламиноимидазол карбоксилаза	-1,28	-1,34	-1,36
LRK_05590	АТФ-синтаза F0F1 субъединица В	-1,31	-1,28	-1,31
LRK_06470	Гликозилтрансфераза	-1,36	-1,35	-1,32
LRK_08400	Фосфатный АВС-транспортер АТФ- связывающий белок	-1,38	-1,43	-1,38
LRK_12400	Субъединица ПВ транспортера фруктозы ФТС	-1,45	-1,45	-1,47

Из таблицы 1 видно, что при любой концентрации цитокинов наблюдается схожий экспрессионный профиль. Это говорит о том, что эффект влияния интерлейкинов не является дозозависимым для штамма *L. rhamnosus* K32.

Влияние примесей рекомбинантных цитокинов га ДЭГ штамма *L. rhamnosus* K32

На основе предыдущего эксперимента для изучения механизма, лежащего в основе реакции лактобацилл на воспаление, был проведен анализ влияния примесей рекомбинантных интерлейкинов на транскрипционный анализ. В образце *L. rhamnosus* K32, культивируемом с IL-10, по сравнению с контрольным образцом с GFP обнаружили 105 ДЭГ, включая 44 гена с пониженной экспрессией и 61 ген с повышенной экспрессией. После воздействия TNF α и IL-8 не выявили ДЭГ, чья экспрессия изменяется более чем в 2 раза (рисунок 4).

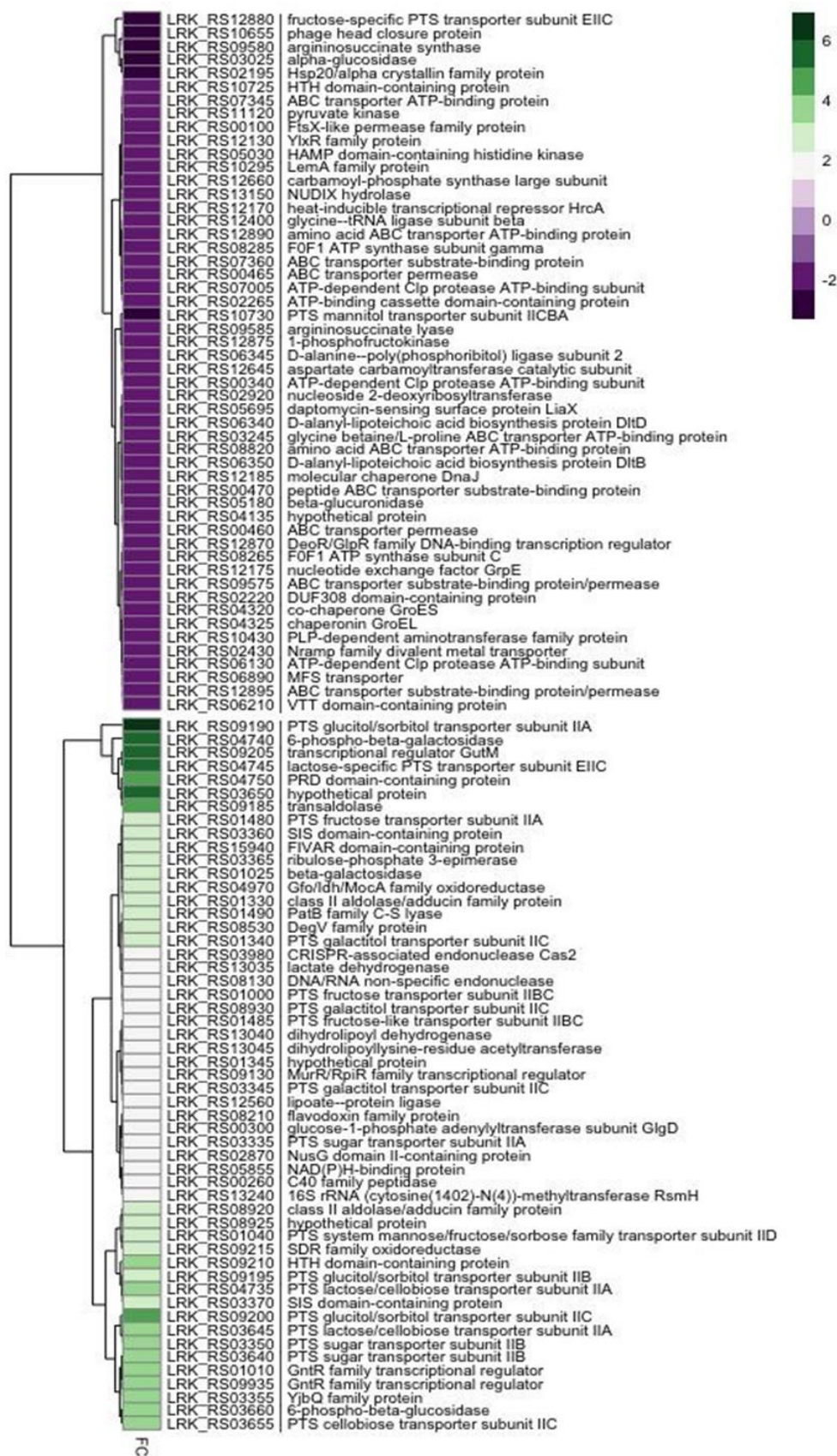


Рисунок 4 - ДЭГ штамма *L. rhamnosus* K32 с цитокином IL-10 относительно рекомбинантного белка GFP.

Из рисунка 4 видно, что на передний план выходят ДЭГ, относящиеся к фосфотрансферазной системе, ответственной за транспорт сахаров в клетку.

Анализ влияния примесей показал, что только для IL-10 есть ДЭГ, достоверно меняющих свою экспрессию. Для TNF α и IL-8 таких ДЭГ не обнаружено, что говорит о том, что их наблюдаемый эффект скорее принадлежит к реакции на примеси в образцов цитокинов.

Функциональная аннотация ДЭГов *L. rhamnosus* K32

Далее ДЭГ сгруппировали в функциональные категории в соответствии с системой классификации базы данных EggNOG v5.0 (рисунок 5).

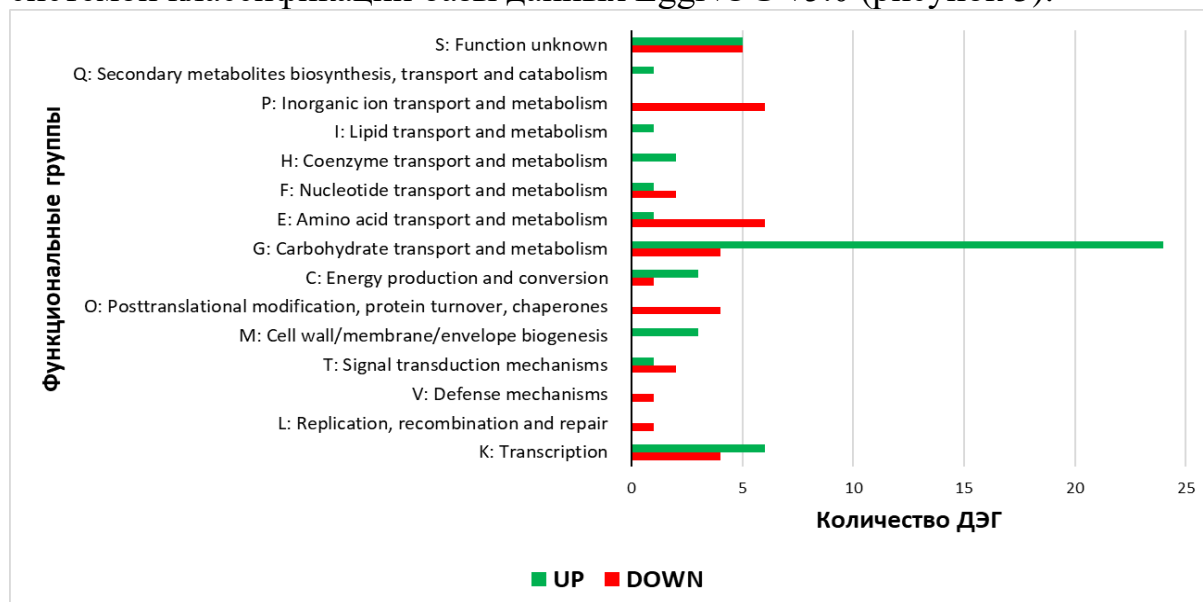


Рисунок 5 - Функциональная классификация ДЭГ штамма *L. rhamnosus* K32 с цитокином IL-10 со статистически значимым изменением экспрессии уровня мРНК по сравнению с контролем GFP (зеленым повышенная экспрессия, красным пониженная)

Функциональный анализ показал, что ДЭГ относятся к транспорту и метаболизму углеводов, производству и преобразованию энергии, биогенезу клеточной стенки/мембраны, транспорту и метаболизму нуклеотидов, репликации, рекомбинации и репарации может свидетельствовать о переходе к защитному режиму и замедлению темпов деления клеток.

Эволюционно стабильные группы генов и транскрипционная организация ДЭГ *L. rhamnosus* K32

Для выявления предполагаемых оперонов среди обнаруженных ДЭГ были использованы результаты филогенетического профилирования. В результате работы скрипта пары генов со сходными ФП, расположенные на одной цепи в пределах 10 000 нуклеотидов и имеющие одинаковый знак дифференциальной экспрессии, были объединены в группы функциональных партнеров и обозначены как потенциальные опероны. Под воздействием IL-10 было обнаружено 6 возможных групп генов штамма *L. rhamnosus* K32.

Среди эволюционно стабильных групп ДЭГ выделяются опероны, относящиеся к ФТС транспорта сорбитола в клетку. Подвержен воздействию и оперон, относящийся к системе защиты от теплового шока. А также снижается экспрессия генов оперона, отвечающего за биосинтез D-аланин-липотейхоевой кислоты.

Анализ ДЭГ под действием TNF α у штаммов *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32

Для определения существует ли общая реакция важных представителей здоровой кишечной микробиоты на TNF α было проведено функциональное сравнение ДЭГ у штаммов *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32 под действием этого цитокина (10 нг/мл) (рисунок 6).

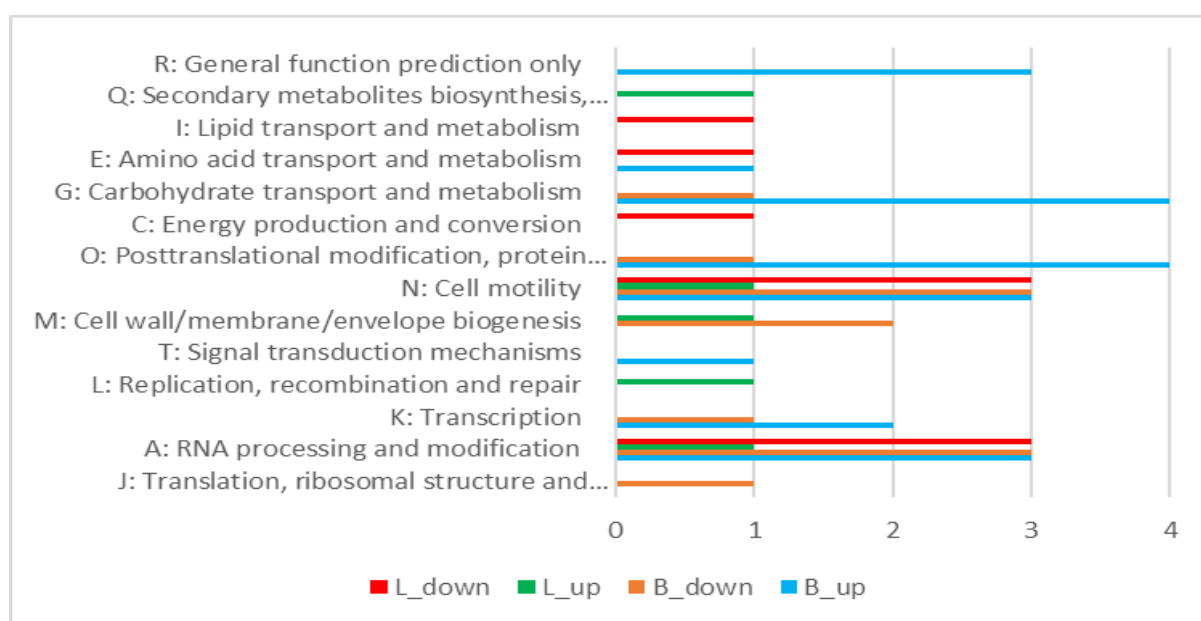


Рисунок 6 - Функциональный анализ ДЭГ у *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32 под действием TNF α в концентрации 10 нг/мл. С повышенной (зеленая полоска для *L. rhamnosus* K32, голубая для *B. longum* GT15) и с пониженной (красная полоска для *L. rhamnosus* K32, оранжевая для *B. longum* GT15) экспрессией.

ДЭГ у *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32 под воздействием TNF α пересекаются в 4 функциональных группах. Стоит отметить, что в этих группах есть ДЭГ с пониженной экспрессией функционально относящиеся процессингу и модификации РНК, как и *B. longum* GT15, так и *L. rhamnosus* K32. Однако из-за небольшого количества генов подверженных влиянию TNF α сложно утверждать о сходном механизме ответа. Анализ транслированных белковых последовательностей не выявил общего между ДЭГ *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32 индуцированных TNF α .

ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс роста штамма бактерий и перехода из одной стадии роста в другую сопровождается значительными изменениями экспрессионных профилей клеток. Так, в культуре клеток штамма *B. longum* GT15 в лаг-фазе наблюдалось повышение экспрессия генов, в основном АВС-транспортёров, связанных с активной утилизацией субстратов. В экспоненциальной фазе в значительной степени экспрессировались гены, продукты которых вовлечены в синтез аминокислот (аланина и аргинина), энергетический обмен (гликолиз/глюконеогенез и азотный обмен) и трансляцию, что способствуют активному делению клеток. В свою очередь в стационарной фазе наблюдалось снижение экспрессии генов, участвующих в контроле скорости деления клеток, и повышение экспрессии генов, участвующих в метаболических путях, связанных с защитой. Последнее обеспечивает выживание клеток в условиях недостатка питательных веществ.

Транскриптомный анализ штамма *B. longum* GT15 выявил, что транскрипция гена BLGT_RS00625, кодирующего Hsp20, увеличивалась в 5 раз в штамме *B. longum* GT15, подвергнутому воздействию TNF α . В исследовании Nagasawa T. и Yu D. была подчеркнута важная роль белка Hsp20 в уменьшении воспаления. Среди генов штамма *B. longum* GT15, изменяющих свою экспрессию, выделяются гены АВС-транспортёров. Для этих генов (BLGT_RS02915, BLGT_RS02975, BLGT_RS03250, BLGT_RS04525, BLGT_RS08190, BLGT_RS08485) показано более чем двукратное увеличение транскрипции. Это можно объяснить борьбой клетки за поддержание гомеостаза стрессовых условиях во время воспаления в организме хозяина. Увеличение экспрессии АВС-транспортёров, способствующих притоку сахаров, приводит к их накоплению в клетке с последующим увеличением синтеза АТФ. Кроме того, экспрессия гена, кодирующего АВС-транспортёр цинка (BLGT_RS03250), увеличивалась в 3,19 раза. Эффективное усвоение цинка имеет решающее значение для адекватного ответа иммунной системы хозяина. Одна из описанных стратегий иммунной системы заключается в снижении концентрации цинка, железа и марганца в месте воспаления. Поэтому TNF α может стимулировать секвестрацию цинка бифидобактериями, пока он еще доступен.

Транскрипция гена белка семейства DedA (BLGT_RS07650) оказалась снижена. Ранее было показано, что этот белок повышает чувствительность бифидобактерий к температуре и рН. Таким образом бактериальная клетка становится более устойчивой к повышенной температуре. Повышенная устойчивость к температуре может объяснять повышенную экспрессию гена BLGT_RS00625, отвечающего за реакцию на тепловой шок.

По данным функционального анализа и филогенетического профилирования, воздействие TNF α изменяет в основном экспрессию генов, включенных в энергетические пути. Это можно объяснить тем, что требуются дополнительные источники энергии для поддержания жизнеспособности клеток в

условиях воспаления и последующей иммунной реакцией организма хозяина. Напротив IL-6 не влияет на экспрессию функциональных групп. Наблюдаемые эффекты цитокинов на штамм *B. longum* GT15 были кумулятивными и продолжительными, что способствует адаптации к новым условиям.

Под воздействием TNF α активизируются гены метаболизма глутатиона. У штамма *B. longum* GT15 не полный метаболический путь биосинтеза глутатиона, поэтому тиоредоксин-зависимая антиоксидантная система может быть основной системой окислительно-восстановительного гомеостаза, которая тесно переплетена с биосинтезом глутатиона.

Воздействие TNF α также стимулировало экспрессию генов, участвующих в метаболизме пропионата. Пропионат потенциально является одним из основных метаболитов, объясняющих пробиотическое действие бифидобактерий. Ранее было показано, что пропионат уменьшает воспаление, снижая кровяное давление в месте воспаления.

Анализ ДЭГ для штамма *L. rhamnosus* K32 показал, что влияние цитокинов IL-8, IL-10 и TNF α в различных концентрациях (0,1, 1 и 10 нг/мл) не является дозозависимым. При различных концентрациях цитокинов наблюдается схожее изменение экспрессии генов. Это возможно связано с тем, что даже небольшие количества цитокинов могут занять рецепторы и вызывать биологические эффекты. Это может объяснять почему увеличение концентрации цитокинов не меняет уровень экспрессии затрагиваемых ДЭГ.

Штамм *L. rhamnosus* K32 меняет свой экспрессионный профиль в ответ на добавление в среду только IL-10. Воздействие IL-10 активирует регуляторы систем транспорта сахаров. ФТС играет роль во многих аспектах физиологии бактерий. Установленные первичные функции системы включают транспорт и фосфорилирование сахаров, а также рецепцию сахара для хемотаксических ответов, тогда как вторичные функции включают различные разветвления регуляции метаболизма и транскрипции (Lengeler and Jahreis 2009). Активация генов ФТС говорит о том, что требуется тонкая регуляция метаболических процессов для обеспечения выживаемости во время воспалительного процесса.

Активируются гены транскетолазы, что говорит о накоплении АТФ для реализации механизмов устойчивости клетки в условиях воспалительного процесса. Транскетолаза играет важную роль в центральном метаболическом пути, обеспечивающем клетки такими важными окислительно-восстановительными кофакторами, как НАДФН, и компонентами для биосинтеза нуклеиновых кислот.

Снижение экспрессии генов биосинтеза D-аланин-липотейхоевой кислоты может приводить к снижению темпов деления клеток, так как это соединение является важной частью клеточной стенки грамположительных бактерий. Дополнительное добавление к культуре бактерий D-аланина снижает отрицательный заряд клеточной оболочки, тем самым предотвращая достижение цели действия катионных антимикробных пептидов (КАМП) на бактериальной поверхности. Ковалентное присоединение катионных молекул, таких как D-

аланин позволяет бактериям регулировать свой суммарный отрицательный заряд, что приводит к отталкиванию положительно заряженных иммунных факторов хозяина (Nizet 2006). Многие патогенные бактерии разработали стратегии резистентности, включающие снижение отрицательного заряда клеточной оболочки, тем самым уменьшая электростатические взаимодействия между КАМП и отрицательно заряженными тейхоевой кислотой (ТК), которые являются ключевыми компонентами их клеточной оболочки.

ДЭГ с повышенной экспрессией участвуют в углеводном обмене и транспорте, а также производстве и преобразовании энергии. Это может быть связано с накоплением энергии для интенсивных энергозатратных процессов, связанных с воспалительным процессом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе было показано, что есть тесная связь между иммунной системой хозяина и комменсальной микробиотой. Бифидобактерии и лактобациллы могут не только активировать выработку провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, но также и реагировать на них активировав свои системы защиты от воспалительных процессов. Полученные данные показывают, как меняется экспрессионный профиль *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32 при добавлении в среду провоспалительных цитокинов. Изменения метаболических путей *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32 под воздействием TNF α и IL-10 можно охарактеризовать как направленные на накопление дополнительной энергии в условиях моделирования воспалительного процесса. Изменения метаболических путей *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32 под воздействием TNF α и IL-10 можно охарактеризовать как направленные на защиту клетки в условиях моделирования воспалительного процесса. Экспрессируются гены, включенные в энергетические пути (углеводный обмен и транспорт). В условиях воспалительного процесса для активации защитных систем, перераспределения ресурсов для синтеза метаболитов, способствующих сохранению жизнеспособности клеток в данных условиях, требуются дополнительные источники энергии и повышение экспрессии генов энергетических путей. Экспрессируются гены транспорта и метаболизма углеводов могут способствовать предоставлению дополнительных источников энергии и тем самым увеличивать выживаемость клеток во время воспалительного процесса и последующего иммунного ответа организма хозяина. Полученные данные могут быть применены для разработки пробиотических лекарственных средств и антимикробных агентов для лечения воспалительных заболеваний кишечника и дисбактериозов.

ВЫВОДЫ

1. В экспоненциальной фазе роста активируются гены, отвечающие за синтез аминокислот, энергетический метаболизм, а также гены, участвующие в трансляции, а в стационарной фазе гены, связанные с защитными функциями.

2. Исследование влияния цитокинов IL-6 и IL-8 на рост штамма *B. longum* GT15 и IL-10, TNF α , IL-6 и IL-8, на рост штаммов и *L. rhamnosus* K32 выявило статистически достоверное замедление роста только для штамма *B. longum* GT15 в присутствии IL-6.

3. Цитокин TNF α изменяет экспрессионный профиль штамма *B. longum* GT15, в то время как IL-10 изменяет профиль штамма *L. rhamnosus* K32, при этом ДЭГ не меняют уровень экспрессии под действием разной концентрации интерлейкина.

4. Под воздействием TNF α активируются 38 оперонных групп, большинство из которых относятся к транспорту и метаболизму сахаров.

5. Филогенетическое профилирование и транскриптомный анализ выявили, что в присутствии цитокинов IL-10 для *L. rhamnosus* K32 и TNF α для *B. longum* GT15 ДЭГ вовлечены преимущественно в энергетические пути (углеводный обмен и транспорт сахаров в клетку).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. **Veselovsky, V. A.**, Dyachkova, M. S., Menyaylo, E. A., Polyayeva, P. S., Olekhnovich, E. I., Shitikov, E. A., Bespiatykh, D. A., Semashko, T. A., Kasianov, A. S., Ilina, E. N., Danilenko, V. N., & Klimina, K. M. (2020). Gene Networks Underlying the Resistance of *Bifidobacterium longum* to Inflammatory Factors. *Frontiers in immunology*, 11, 595877. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.595877>
2. **Veselovsky, V. A.**, Dyachkova, M. S., Bespiatykh, D. A., Yunes, R. A., Shitikov, E. A., Polyayeva, P. S., Danilenko, V. N., Olekhnovich, E. I., & Klimina, K. M. (2022). The Gene Expression Profile Differs in Growth Phases of the *Bifidobacterium Longum* Culture. *Microorganisms*, 10(8), 1683.
3. **Veselovsky, V. A.**; Dyachkova, M. S.; Olekhnovich, E. I.; Klimina, K. M. (2022), Gene networks underlying the mechanisms of resistance to inflammatory factors in *Bifidobacterium longum* and *Lacticaseibacillus rhamnosus*. *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022)*, 505-505, 2022

Тезисы докладов в материалах конференций:

1. ***The International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health 2020***

Авторы: **Vladimir Veselovsky**, Marina Dyachkova, Egor Menyalo, Polina Polyayeva, Evgenii Olekhnovich, Tatiana Semashko, Artem Kasianov, Elena Ilina, Valeriy Danilenko, Ksenia Klimina.

Название: Gene networks underlying the mechanisms of resistance to inflammatory factors in *Bifidobacterium longum*

2. ***Научная конференция молодых ученых ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России 2020***

Авторы: **Веселовский В.А.**, Дьячкова М.С., Беспятых Д.А., Олехнович Е.И., Семашко Т.А., Климина К.М.

Название: Генные пути реализации устойчивости штамма *B. longum* GT15 к факторам иммунного ответа

3. ***13th International Multiconference on "Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology" – BGRS/SB-2022***

Авторы: **Veselovsky V.A.**, Dyachkova M.S., Olekhnovich E.I., Klimina K.M

Название: Gene networks underlying the mechanisms of resistance to inflammatory factors in *Bifidobacterium longum* and *Lacticaseibacillus rhamnosus*

4. ***Первый Российский конгресс по медицинской микробиологии и инфектологии (РКММИ). 2023***

Авторы: **Веселовский В.А.**, Олехнович Е.И., Климина К.М.

Название: Дифференциальный транскриптомный анализ кандидатов и фармбиотики у бифидобактерий.