

Разработка алгоритмов и подходов для изучения перспективных штаммов-фармабиотиков с использованием омиксных технологий

Марсова М.^{1*}, Резникова Д.^{1, 2}, Летвинова В.¹, Галанова О.^{1, 2}

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет) (МФТИ), Москва, Россия

* masha_marsova@mail.ru

Ключевые слова: омиксные технологии; фармабиотики; протеомный анализ; антиоксиданты; микробиом

Мотивация и цель: Различия между микробиомами клинически здоровых людей и людей, с проблемами здоровья, могут служить как диагностическим признаком, так и целью для последующей терапии. В свете неутешительной статистики роста случаев неинфекционных хронических заболеваний, возможность коррекции микробиома приобретает новые смыслы. При этом перспективы практического применения традиционных пре- и пробиотиков остаются размытыми. На смену им должно прийти новое поколение стандартизированных препаратов, нацеленных на коррекцию конкретных нозологий.

Цель – разработка принципиально новых подходов и алгоритмов исследования перспективных штаммов-фармабиотиков, позволяющих выявить молекулярные факторы и механизмы, обеспечивающие их клиническую эффективность.

Методы и алгоритмы: Для исследования, в качестве перспективного фармабиотика, был выбран штамм *Levilactobacillus brevis* 47f, проявивший наибольшую среди родственных штаммов адаптогенную и антиоксидантную активность в моделях *in vitro* (при помощи биOLUMИнесцентных тестов) и *in vivo* (на моделях индуцированного мукозита у мышей, стресса, вызванного у мышей и низкодозового воздействия ксенобиотиков у рыб *Danio rerio*) [1–4].

Для выявления действующего начала *L. brevis* 47f применялись как традиционные биологические модели и сравнительный геномный анализ, так и омиксные подходы: протеомные, транскриптомные и метаболомные методы.

В исследовании были использованы результаты сравнительного геномного анализа *L. brevis* 47f (WGS PRJNA280953 в базе GenBank) и родственных штаммов из базы NCBI, а также каталог генов, способных влиять на проявление антиоксидантной активности [5, <https://github.com/Alexey-Kovtun/Catalog>].

Тотальную РНК для транскриптомного анализа выделяли на автоматизированной станции King Fisher с помощью MagMax™ mirVana™. Готовые библиотеки секвенировали на приборе Illumina HiSeq 2500. Для составления карты считываний и оценки количества транскриптов использовалось программное обеспечение Kallisto версии 0.46.0. Дифференциальный анализ экспрессии проводили с помощью edgeR пакет v3.26.8 интегрирован в веб-инструмент Degust v4.1.1.

Хромато-масс-спектрометрический анализ внутриклеточных белков проводили при помощи обращенно-фазной хроматографии на приборе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific), соединенным с масс-спектрометром Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific). Полученные данные анализировали при помощи программы Peaks studio 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc.). Идентификацию белков проводили посредством корреляции tandemных масс-спектров с базой данных белковых последовательностей из базы Uniprot.

Летучие метаболиты культуральной жидкости анализировали на приборе ГХ/МС Shimadzu QP2010 Ultra с парофазным экстрактором Shimadzu HS-20, колонкой VF-WAX MS. Для обработки хроматограммы использовали ПО Shimadzu LabSolutions и библиотеки масс-спектров NIST14 с пакетом AMDIS, который обнаруживает соединения на хроматограмме и получает очищенные масс-спектры для каждого соединения.

В качестве дополнительных методов проводили гель-электрофорез внутриклеточных белков и белков культуральной жидкости с масс-спектрометрическим исследованием характерных белковых фракций.

Данные протеомного, транскриптомного и метаболомного анализа были проанализированы при помощи разработанных биоинформатических алгоритмов с использованием языка программирования Python и машинного обучения. Полученные результаты сопоставлялись с данными стандартных физико-химических методов.

Результаты: Сравнительный геномный анализ позволил выявить ряд не характерных для *Levilactobacillus brevis* генов, продукты которых способны влиять на проявляемые в биологических моделях свойства штамма. Например, глутаредоксин-подобный белок NrdH, глутатион редуктаза/НАД(Ф)/ФАД-зависимая оксидоредуктаза, Dyr-type пероксидаза и др. Транскрипты соответствующих генов, а также белки были обнаружены в результатах транскриптомного и протеомного анализа соответственно. Сопоставление результатов, полученных при помощи омиксных технологий и физико-химических методов анализа, позволяет сделать предположения о возможных механизмах и метаболитах, вовлеченных в осуществление наблюдаемой антиоксидантной активности. В частности, некоторые выявленные белки и метаболиты могут проявлять не только антиоксидантную, но и иммуномодулирующую активность, служить сигнальными молекулами, обеспечивающими взаимодействие *L. brevis* с другими бактериальными и эукариотическими клетками.

Выводы: Использование комплекса омиксных технологий для характеристики перспективных штаммов, может являться перспективным направлением для обнаружения биологически-активных веществ и механизмов их действия. В свою очередь, многие аспекты подобных исследований требуют доработки. В частности – методики стандартизации и сопоставления результатов, полученных при помощи различных омиксных технологий.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом (Грант № 23-16-00123).

Development of algorithms and approaches for the studying promising strains of pharmacobiotic using omics technologies

Marsova M.^{1, 2*}, Reznikova D.^{1, 2}, Letvinava V.¹, Galanova O.^{1, 2}

¹ Vavilov Institute of General Genetics RAS (VIGG), Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), (MIPT), Moscow, Russia

* masha_marsova@mail.ru

Key words: omics technologies; pharmacobiotics; proteomic analysis; antioxidants; microbiome

Motivation and Aim: Differences between the microbiomes of clinically healthy people and people with health problems can serve as both a diagnostic sign and a goal for subsequent therapy. In light of the disappointing statistics on the increase in cases of non-communicable chronic diseases, the possibility of microbiome correction takes on new meanings. At the same time, the prospects for the practical application of traditional pre- and probiotics remain blurred. They should be replaced by a new generation of standardized drugs aimed at correcting specific nosologies.

Methods and Algorithms: For the study, the *Levilactobacillus brevis* 47f strain was taken as a promising pharmacobiotic, which showed the greatest adaptogenic and antioxidant activity among related strains in *in vitro* models (using bioluminescent tests) and *in vivo* (on models of stress in mice and low-dose exposure to xenobiotics in *Danio rerio* fish) [1–4].

To identify the active principle of *L. brevis* 47f used both traditional biological models and genomic analysis, as well as omics approaches: proteomic, transcriptomic and metabolomic methods.

The study used the results of comparative genomic analysis of *L. brevis* 47f (WGS PRJNA280953 in the GenBank database) and related strains from the NCBI database, as well as a catalog of genes capable of influencing the manifestation of antioxidant activity [5, <https://github.com/Alexey-Kovtun/Catalog>].

Total RNA for transcriptomic analysis was isolated at the automated KingFisher station using MagMax mirVana. The finished libraries were sequenced on the Illumina HiSeq 2500 device. To compile a reading map and estimate the number of transcripts, Kallisto software version 0.46.0 was used. Differential expression analysis was performed using edgeR package v3.26.8 integrated into the Degust v4.1.1 web tool.

Intracellular proteins was performed using reverse-phase chromatography on the Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific) device connected to the Q Exact Plus Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) by means of a nanoelectrospray source (Thermo Fisher Scientific). The obtained data were analyzed using the program Peak studio 10.0 (BioinformaticsSolutions Inc.). Protein identification was performed by correlating tandem mass spectra with a database of protein sequences from the Uniprot database.

Volatile metabolites of the culture fluid were analyzed on a GC device/MS Shimadzu QP2010 Ultra with steam phase extractor Shimadzu HS-20, column VF-WAX MS. To process the chromatogram, Shimadzu LabSolutions software and the NIST14 mass spectrum library with the AMDIS package were used, which detects compounds on the chromatogram and receives purified mass spectra for each compound.

Gel electrophoresis of intracellular proteins and proteins of culture fluid with mass spectrometric examination of characteristic bands was performed as additional methods. The data of proteomic, transcriptomic and metabolomic analysis were analyzed using the developed bioinformatic algorithms using the Python programming language and machine learning. The obtained results were compared with the data of standard physico-chemical methods.

Results: Comparative genomic analysis revealed a number of genes uncharacteristic for *Levilactobacillus brevis*, the products of which are able to influence the properties of the strain manifested in biological models. For example, glutaredoxin-like protein NrdH, glutathione reductase/NAD(F)/FAD-dependent oxidoreductase, Dyp-type peroxidase, etc. Transcripts of the corresponding genes, as well as proteins, were found in the results of transcriptomic and proteomic analysis, respectively. A comparison of the results obtained using omics technologies and physico-chemical analysis methods allows us to make assumptions about possible mechanisms and metabolites involved in the implementation of the observed antioxidant activity. In particular, some of the identified proteins and metabolites can exhibit not only antioxidant, but also immunomodulatory activity, serve as signaling molecules that ensure the interaction of *L. brevis* with other bacterial and eukaryotic cells.

Conclusion: The use of a complex of office technologies to characterize promising strains, search for biologically active substances and the mechanisms of their action may be a promising direction. In turn, many aspects of such studies require improvement. In particular, the methods of standardization and comparison of the results obtained with the help of omics technologies.

Funding: The study is supported by Russian Science Foundation (No. 23-16-00123).

Список литературы/References

1. Marsova M., Abilev S., Poluektova E., Danilenko V. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of lactobacillus strains from human microbiota. *World J Microbiol Biotechnol.* 2018;34(2):27. doi 10.1007/s11274-018-2410-2
2. Marsova M., Odorskaya M., Novichkova M. et al. The *Lactobacillus brevis* 47f strain protects the murine intestine from enteropathy induced by 5-fluorouracil. *Microorganisms.* 2020;8(6):876. doi 10.3390/microorganisms8060876
3. Olekhovich E.I., Batotsyrenova E.G., Yunes R.A. et al. The effects of *Levilactobacillus brevis* on the physiological parameters and gut microbiota composition of rats subjected to desynchronization. *Microb Cell Fact.* 2021;20:226. doi 10.1186/s12934-021-01716-x
4. Kochetkov N., Smorodinskaya S., Vatlin A. et al. Ability of *Lactobacillus brevis* 47f to alleviate the toxic effects of imidacloprid low concentration on the histological parameters and cytokine profile of zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Mol Sci.* 2023;24(15):12290. doi 10.3390/ijms241512290
5. Averina O.V., Poluektova E.U., Marsova M.V., Danilenko V.N. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic *Lactobacilli* and *bifidobacteria* as representatives of the human gut microbiota. *Biomedicines.* 2021;9(10):1340. doi 10.3390/biomedicines9101340
6. Poluektova E.U., Averina O.V., Kovtun A.S., Danilenko V.N. Transcriptomic analysis of *Levilactobacillus brevis* 47f strain under conditions of oxidative stress. *Genetics.* 2023;59(8):888-897