

Идентификация бактерий, способствующих улучшению результатов иммунотерапии меланомы

Строкач А.А.^{1*}, Морозов М.Д.¹, Зорук П.Ю.¹, Веселовский В.А.¹,
Колдман В.А.^{1,2}, Колдман С.Д.^{1,2}, Олехнович Е.И.¹, Климина К.М.¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

² Государственный научный центр Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

* alexandra.vlasova.2017@yandex.ru

Ключевые слова: иммунотерапия анти-PD1; NGS; кишечная микробиота

Мотивация и цель: Микробиота кишечника человека выполняет множество функций важных для поддержания здоровья и регуляции иммунной системы. В научной литературе имеется связь между составом микробиоты кишечника и результатами иммунотерапии злокачественных опухолей [1]. Эта зависимость была подтверждена экспериментами по пересадке микробиоты от пациентов мышам, лишенным микробиоты, а также пациентам с негативными результатами лечения [2, 3], однако четкого понимания биологических механизмов все еще нет. Поэтому целью данного исследования была систематизация метагеномных данных из открытых источников и валидирование полученных результатов с использованием экспериментальной модели меланомы.

Методы и алгоритмы: С использованием модели смешанных эффектов (ZicoSeq) были проанализированы таксономические профили 680 кишечных метагеномов пациентов, проходивших иммунотерапию, из семи ранее опубликованных исследований (базы данных NCBI-EBI). Для повышения достоверности результатов в анализе были использованы различные стратегии коррекции эффектов множественного тестирования гипотез. В частности, использовались поправки на множественное сравнение: FWER (family-wise error rate) – вероятность совершить хотя бы одну ошибку первого рода и FDR (false discovery rate) – для учета вероятности ошибки второго рода. Для проведения исследования на мышинной модели меланомы был выбран штамм *B. adolescentis* 150 [4]. В исследованиях использовались самки мышей C57Bl/6 весом 17–20 г, приобретенные в питомнике «Филиал Столбовая ФГБУН НЦБМТ ФМБА России». Мышам была привита культура клеток меланомы B16/F1. Вводилась лиофильная культура бифидобактерий и раствор антитела PD-1 в соответствии с разработанным протоколом исследования. В дальнейшем проводился сбор мышинных фекалий для оценки бактериального разнообразия посредством секвенирования гена 16S рПНК на Oxford Nanopore Technologies. Транскриптомное секвенирование тотальной РНК опухоли применялось для количественной оценки уровня экспрессии генов.

Результаты: В результате анализа *Bifidobacterium adolescentis* была идентифицирована как единственный строгий биомаркер положительного исхода иммунотерапии, прошедший установленные пороги достоверности (FWER $p < 0.05$; FDR $p < 0.05$). Чтобы подтвердить потенциальное воздействия

B. adolescentis на результаты иммунотерапии было проведено исследование влияния анти-PD-1 терапии в комбинации с бифидобактериями на лечение экспериментальной модели меланомы.

Выводы: Результаты экспериментов на мышах показали, что введение штамма *B. adolescentis* 150 не только способствовал увеличению роста экспериментальной меланомы, но также приводил к повышению количества условно-патогенных бактерий в кишечнике. На основе анализа данных транскриптома, повышалась экспрессия опухолевых генов *Ero1l*, *Mtss1l*, *Atf3*, *Mitf*, *Mxi1*, *Vegfa*, *Slc2a1*, которые, согласно литературным данным, ассоциируются с метастазированием и прогрессированием опухоли [5–7].

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда, соглашение № 22-75-10029. Информация о проекте доступна по ссылке <https://rscf.ru/project/22-75-10029/>.

Identification of bacteria contributing to the improvement of melanoma immunotherapy results

Strokach A.^{1*}, Morozov M.¹, Zoruk P.¹, Veselovsky V.¹, Koldman V.^{1,2}, Koldman S.^{1,2}, Olekhovich E.¹, Klimina K.¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

² Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

* alexandra.vlasova.2017@yandex.ru

Key words: immunotherapy anti-PD1; NGS; gut microbiota

Motivation and Aim: The human gut microbiome plays an important role in maintaining health and regulating the immune system. There is a growing body of scientific evidence linking the composition of intestinal microbiota to the effectiveness of immunotherapy for cancer [1]. However, the exact mechanisms behind this relationship are still not fully understood.

This study aims to systematically analyze metagenomic data from publicly available sources and validate its findings using an experimental model of melanoma.

Methods and Algorithms: *B. adolescentis* 150 was selected for the study in a mouse model of melanoma [4]. The studies used female C57BL/6 mice, weighing between 17 and 20 g, which were purchased from the "Stolbovaya Branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of the National Research Institute of FMBA of Russia." The mice were then vaccinated with a melanoma cell culture derived from the B16/F1 cell line. After that, a lyophilized culture of bifidobacteria and a PD-1 antibody solution were injected into the mice according to the developed research protocol. Later, faecal samples were collected from the mice to assess bacterial diversity using sequencing of the 16S rRNA gene at Oxford Nanopore Technologies. In addition, transcriptomic sequencing of the total tumor RNA was performed to quantify gene expression levels.

Results: As a result of the analysis, *Bifidobacterium adolescentis* was identified as the only strict biomarker for a positive outcome from immunotherapy that met the established confidence thresholds (FWER $p < 0.05$; FDR $p < 0.05$).

To confirm the potential impact of *B. adolescentis* on immunotherapy outcomes, a study was conducted to investigate the effect of anti-PD-1 therapy combined with *B. adolescentis* in an experimental melanoma model.

Conclusion: The results from experiments on mice demonstrated that the administration of the *B. adolescentis* 150 strain not only promoted the growth of experimental melanoma but also increased the number of opportunistic bacteria in the intestines. Based on transcriptome data analysis, the expression levels of genes associated with tumor progression and metastasis, such as *Ero1l*, *Mtss1l*, *Atf3*, *Mitf*, *Mxi1*, and *Vegfa*, increased. These genes have been linked to tumor metastasis and disease progression in previous studies [5–7].

Funding: Financial support for this study was provided by the Russian Science Foundation under the grant number 22-75-10029, available at <https://rscf.ru/project/22-75-10029/>.

Список литературы/References

1. Lu Y. et al. Gut microbiota influence immunotherapy responses: mechanisms and therapeutic strategies. *J Hematol Oncol*. 2022;15(1):47. doi 10.1186/s13045-022-01273-9
2. Routy B. et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 2018;359:91-97
3. Gopalakrishnan V. et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018;359:97-103
4. Dyachkova M.S. et al. Draft genome sequences of bifidobacterium angulatum GT102 and bifidobacterium adolescentis 150: focusing on the genes potentially involved in the gut-brain axis. *Genome Announc*. 2015;3(4):e00709-15. doi 10.1128/genomeA.00709-15
5. Kajiwarra T. et al. Hypoxia augments MHC class I antigen presentation via facilitation of ERO1- α -mediated oxidative folding in murine tumor cells. *Eur J Immunol*. 2016;46:2842-2851
6. Muto S. et al. Wnt/ β -Catenin signaling and resistance to immune checkpoint inhibitors: from non-small-cell lung cancer to other cancers. *Biomedicines*. 2023;11(1):190. doi 10.3390/biomedicines11010190
7. Rodolfo M., Daniotti M., Vallacchi V. Genetic progression of metastatic melanoma. *Cancer Lett*. 2004;214:133-147