

Определение генетической сигнатуры химически поляризованных макрофагов крысы

Киселева В.^{1, 2*}, Вишнякова П.^{1, 2}, Лохонина А.^{1, 2, 3}, Машкова О.⁴, Карпулевич Е.⁴, Фатхудинов Т.^{1, 2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», Москва, Россия

³ НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт системного программирования им. В.П. Иванникова РАН, Москва, Россия

* Victoria.kurnosova.1991@gmail.com

Ключевые слова: макрофаги; дифференциально экспрессируемые гены; M(ЛПС); M(IL4/IL10)

Мотивация и цель: Макрофаги – клетки врожденного иммунного ответа, которые в зависимости от окружающих условий могут проявлять два противоположных состояния – провоспалительное и противовоспалительное. В эру персонализированной медицины и развития клеточных технологий они представляют большой интерес, так как играют значительную роль в патогенезе многих заболеваний. Изучение роли и потенциального терапевтического эффекта макрофагов часто проводят на модельных животных, являющихся мостиком между наукой и клиникой. И если иммунные процессы мыши описаны довольно подробно, то для крысы остается много белых пятен. Так, в литературе встречаются единичные работы, посвященные изучению механизмов поляризации макрофагов, происходящих из костного мозга, на транскрипционном уровне [1]. Поэтому целью данной работы стало определение генетических сигнатур макрофагов крысы, поляризованных *in vitro* провоспалительными и противовоспалительными стимулами.

Методы и алгоритмы: Моноциты крысы выделяли из костного мозга при градиентном центрифугировании на препарате синтетического высокомолекулярного сополимера полисахарозы (Фиколл) с последующем иммуномагнитным разделением по наличию лейкосиалина (CD43) (трансмембранного гликопротеина, играющего важную роль в клеточной адгезии, дифференцировке и апоптозе). Полученные моноциты дифференцировали в макрофаги в течение 7 дней в присутствии MCSF и далее подвергали химической модификации с помощью ЛПС (провоспалительный ответ, M(ЛПС)) и IL-4/IL-10 (противовоспалительный ответ, M(IL-4/IL-10)) в течение 24 часов. После поляризации клетки были лизированы для дальнейшего анализа транскриптома методом секвенирования следующего поколения (NGS). «Сырые» NGS данные были обработаны несколькими биоинформатическими алгоритмами (*DeSeq2*, *voom+limma*, *EBSeq*, *NOISeq*, *edgeR*). Количественные результаты по генам, полученные применением инструмента *Salmon* [2] к множественному выравниванию, выполненному с помощью STAR [3], были использованы в

пайплайне Hobotnica [4] для оценки выбора лучшего инструмента для анализа дифференциальной экспрессии генов. В соответствии с критерием выбора лучшего инструмента для анализа дифференциальной экспрессии генов [4] был выбран *DeSeq2*, результаты которого были отфильтрованы по порогу 0.1 для скорректированных *p*-значений. Для демонстрации общего результата использовался volcano plot сравнения дифференциальной экспрессии групп М0 и М(ЛПС), М0 и М(IL-4/IL-10)) соответственно.

Результаты: Выявлены значительные изменения в экспрессии более сотни генов. Анализ обогащения (enrichment анализ) выявил, что как после стимуляции ЛПС, так и после IL-4/IL-10 поляризации наиболее представленным сигнальным путем был каскад, ассоциированный с конверсией метаболитов (metabolite inter-conversion enzyme). Следующими по представленности были: белок-модифицирующий каскад (protein modifying enzyme) и сигнальный путь, ассоциированный с трансмембранными сигнальными рецепторами (transmembrane signal receptor) – среди значимо повышенных и пониженных генов соответственно и в М(ЛПС) макрофагах по сравнению с М0 макрофагами. В случае значимо повышенных и пониженных генов в М(IL-4/IL-10) макрофагах по сравнению с М0 макрофагами помимо упомянутых путей были обнаружены каскады, ассоциированные с ген-специфическими регуляторами транскрипции (gene-specific transcriptional regulator) и транспортерами (transporter).

Выводы: В результате проделанной работы была определена генетическая сигнатура макрофагов с провоспалительным и противовоспалительным фенотипом. Были выявлены наиболее активированные сигнальные пути при стимуляции ЛПС и IL-4/IL-10. Результаты секвенирования доступны в GEO (GSE266262).

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом (номер гранта 24-25-00203).

Determination of the genetic signature of chemically polarized rat macrophages

Kiseleva V.^{1, 2*}, Vishnyakova P.^{1, 2}, Lokhonina A.^{1, 2, 3}, Mashkova O.⁴, Karpulevich E.⁴, Fatkhudinov T.^{1, 2}

¹ Federal State Budget Institution “National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov”, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University), Moscow, Russia

³ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

⁴ Federal State Budgetary Institution of Science V.P. Ivannikov Institute of System Programming, RAS, Moscow, Russia

* Victoria.kurnosova.1991@gmail.com

Key words: macrophages; differentially expressed genes; M(LPS); M(IL4/IL10)

Motivation and Aim: Macrophages, the cells of the innate immune response, can exhibit two opposite states, pro-inflammatory and anti-inflammatory, depending on the surrounding conditions. In the era of personalised medicine and the development of cellular technologies, they are of great interest as they play a significant role in the pathogenesis of many diseases. Studies of the role and potential therapeutic effects of macrophages are often carried out on animal models, which are the bridge between science and the clinic. And if the immune processes of the mouse are described in quite detail, there are still many white spots for the rat. Thus, in the literature there are single works devoted to the study of mechanisms of polarization of bone marrow-derived macrophages at the transcriptional level [1]. Therefore, the aim of this work was to determine the genetic signatures of rat macrophages polarized *in vitro* by pro-inflammatory and anti-inflammatory stimuli.

Methods and Algorithms: Rat monocytes were isolated from bone marrow by gradient centrifugation on a preparation of synthetic high-molecular-weight polysaccharose copolymer (Ficoll) followed by immunomagnetic separation for the presence of leukosialin (CD43) (a transmembrane glycoprotein that plays an important role in cell adhesion, differentiation and apoptosis). The resulting monocytes were differentiated into macrophages for 7 days in the presence of MCSF and then chemically modified with LPS (pro-inflammatory response, M(LPS)) and IL-4/IL-10 (anti-inflammatory response, M(IL-4/IL-10)) for 24 hours. After polarization, cells were lysed for further analysis of the transcriptome by next generation sequencing (NGS). ‘Raw’ NGS data were processed by several bioinformatics algorithms (DeSeq2, voom + limma, EBSeq, NOISeq, edgeR). The quantitative gene results obtained by applying the Salmon tool [2] to the multiple alignment performed with STAR [3] were used in the Hobotnica Pipeline [4] to evaluate the choice of the best tool for differential gene expression analysis. According to the criterion for selecting the best tool for analysing differential gene expression [4], DeSeq2 was selected and the results were filtered by a threshold of 0.1 for adjusted p-values. The volcano plot comparing differential expression of M0 and M(LPS), M0 and M(IL-4/IL-10) groups respectively was used to demonstrate the overall result.

Results: Significant changes in the expression of more than a hundred genes were detected. Enrichment analysis revealed that both after LPS stimulation and IL-4/IL-10 polarisation the most represented signal pathway was the cascade associated with metabolite interconversion (metabolite interconversion enzyme). The protein modifying enzyme and the signal pathway associated with transmembrane signal receptors were the next most represented among the significantly up- and down-regulated genes, respectively, and in M(LPS) macrophages compared to M0 macrophages. In the case of significantly upregulated and downregulated genes in M(IL-4/IL-10) macrophages compared to M0 macrophages, cascades associated with gene-specific transcriptional regulators (gene-specific transcriptional regulator) and transporters (transporter) were detected in addition to the above-mentioned pathways.

Conclusion: The genetic signature of macrophages with proinflammatory and anti-inflammatory phenotype was determined. The most activated signalling pathways under LPS and IL-4/IL-10 stimulation were identified. Sequencing results are available at GEO (GSE266262).

Funding: This work was supported by Russian Science Foundation (grant number 24-25-00203).

Список литературы/References

1. Pridans C., Irvine K.M., Davis G.M., Lefevre L., Bush S.J., Hume D.A. Transcriptomic analysis of rat macrophages. *Front Immunol.* 2021;11:594594. doi 10.3389/fimmu.2020.594594
2. Patro R., Duggal G., Love M. et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods.* 2017;14:417-419. doi 10.1038/nmeth.4197
3. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21. doi 10.1093/bioinformatics/bts635
4. Stupnikov A., McInerney C.E., Savage K.I., McIntosh S.A., Emmert-Streib F., Kennedy R., Salto-Tellez M., Prise K.M., McArt D.G. Robustness of differential gene expression analysis of RNA-seq. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021;19:3470-3481. doi 10.1016/j.csbj.2021.05.040