

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Бондарева Марина Александровна

**АНТИГЕННАЯ МИМИКРИЯ КАК МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ
ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА МИКРОБИОТОЙ**

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена в отделе иммунологии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова и в Немецком ревматологическом научном центре (г. Берлин, Германия).

Научный руководитель **Круглов Андрей Алексеевич** – кандидат биологических наук

Официальные оппоненты **Ильина Елена Николаевна** – доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, член-корреспондент РАН, ФБУН Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, дирекция, главный научный сотрудник.

Топтыгина Анна Павловна – доктор медицинских наук, ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г.Н. Габричевского Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов.

Боголюбова-Кузнецова Аполлинария Васильевна – кандидат биологических наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Заведующая лабораторией трансплантационной иммунологии.

Защита диссертации состоится 6 декабря 2024 г. В 16 ч 00 мин на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3217>.

Автореферат разослан « » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

 Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Организм млекопитающих находится в тесном взаимодействии с микроорганизмами, населяющими слизистые оболочки организма. В состав микробного сообщества (микробиоты) входят бактериальная микрофлора, вирусы, микобиота, простейшие, где бактериальная микробиота кишечника является наиболее изученным компартментом. Для организма важным представляется контроль состава микробиоты, поскольку ее дисбаланс ассоциирован с развитием различных заболеваний (ожирение, злокачественные опухоли и аутоиммунные заболевания). В настоящее время изучается роль *Akkermansia muciniphila* при нарушенном метаболизме, где существуют противоречивые данные о протективной или патогенной роли бактерии *A. muciniphila*. Таким образом, вклад *A. muciniphila* в развитие заболевания до конца не установлен.

На слизистых иммуноглобулины Ig (в кишечнике — IgA и IgM, в ротоносоглотке — IgA, IgM, IgG) взаимодействуют с поверхностными антигенами бактерий, тем самым участвуют в контроле состава микробиоты. Учитывая факт, что количество генов микробиоты суммарно на несколько порядков выше, чем количество генов человека, микробиоту можно рассматривать как индуктор огромного репертуара антител, и некоторые из них могут связывать как бактериальные антигены, так и белки организма-хозяина. Состав микробиоты и реакция иммунной системы могут быть изменены за счет влияния различных внешних факторов, таких как диета, экология, вакцинация, токсины и т. д. Так, при инфицировании вирусом SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, острый респираторный коронавирус 2) наблюдается измененный состав микробиоты у тяжелобольных пациентов, а с другой стороны, у людей, не контактировавших с данным вирусом, встречаются антитела IgA на слизистых, специфичные к SARS-CoV-2. Однако механизм появления таких антител и роль микробиоты не были досконально изучены.

Известно также, что IgA важен при ожирении и производится в избыточном количестве у пациентов с диабетом первого и второго типа. Однако детальные механизмы того, как такие антитела индуцируются и какую роль выполняют в контексте нарушенной толерантности к глюкозе, остается не до конца выясненным вопросом.

Целью настоящей исследовательской работы являлось изучение кросс-регуляции иммунного ответа на слизистых и микробиоты в контексте нарушенной толерантности к глюкозе при диете с повышенным содержанием сахара (high glucose diet, HGD) и при иммунном ответе против вируса SARS-CoV-2.

В соответствии с поставленной целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать состав микробиоты слизистых оболочек ротоносоглотки и кишечника и развитие антительного иммунного ответа на слизистых и в крови при вакцинации против SARS-CoV-2.
2. Оценить реактивность антител, индуцированных SARS-CoV-2, к компонентам микробиоты.
3. Определить вклад различных бактерий в развитие анти-Spike-антительного ответа и изучить их роль в защите против вируса SARS-CoV-2.
4. Оценить вклад диеты HGD в нарушение толерантности к глюкозе, в продукцию антител в сыворотке и просвете кишечника, а также оценить влияние на состав микробиоты.
5. Исследовать реактивность IgA-антител, индуцируемых диетой HGD.

Научная новизна работы

В настоящей работе получены оригинальные результаты, свидетельствующие о кросс-регуляции компонентов микробиоты и антител против SARS-CoV-2. А именно был изучен вклад антител против SARS-CoV-2, индуцируемых вакцинацией, в изменение состава микробиоты слизистой кишечника и ротоносоглотки. Были определены бактерии, распознающиеся антителами против Spike-белка. Был выявлен механизм индукции антител против SARS-CoV-2 бактерией вида *Streptococcus salivarius* по типу молекулярной мимикрии и было показано, что пробиотический штамм *S. salivarius K12* способствует выработке IgG-антител в ротовой полости против Spike-белка у вакцинированных людей.

Во второй части работы получены оригинальные результаты, описывающие механизм индукции IgA-антител при нарушении толерантности к глюкозе. Было показано, что IgA-антитела индуцируются компонентами микробиоты, в частности бактерией *Akkermansia muciniphila*, и данный процесс зависит от TLR4-сигнального пути, (Toll-like receptor, Толл-подобный рецептор). Далее эти IgA-антитела кросс-реагируют с тканями организма, в частности с антигенами поджелудочной железы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленные в настоящем исследовании результаты имеют как фундаментальную значимость в иммунологии слизистых оболочек, так и клиническую. Полученные результаты демонстрируют роль микробиоты в индукции антительного ответа против SARS-CoV-2. Кроме этого, показано, что индукция иммунного ответа при вакцинации способна изменять состав микробиоты за счет кросс-реактивности. Наконец, данные по использованию пробиотического штамма *S. salivarius K12* указывают на принципиальную возможность применения различных штаммов бактерий для амплификации

антительного ответа на слизистых оболочках. Вторая часть работы описывает механизм индукции IgA-антител по TLR4-зависимому пути при нарушенной толерантности к глюкозе, что до сих пор было не до конца изучено. Кроме этого, обнаруженные кросс-реактивные свойства таких IgA-антител открывают новые возможности для изучения их вклада в патогенез заболевания. С другой стороны, понимание того, как изменяется состав микробиоты, открывает потенциальные возможности таргетной манипуляции бактерий, что представляет клиническую значимость.

Объектом исследования в первой части работы были доноры, вакцинированные против SARS-CoV-2, а также наивные доноры. Для механистического объяснения природы кросс-реактивных антител против Spike использовались мыши дикого типа на генетической основе C57BL/6 или мыши, экспрессирующие человеческий ACE-2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ангиотензин-конвертирующий фермент 2) под промотором K18 (Keratin 18, Кератин 18). В рамках изучения механизмов взаимодействия микробиоты с иммунной системой при высокоглюкозной диете использовались мыши дикого типа C57BL/6 и с полным нокаутом *Tlr4* на генетической основе C57BL/6.

Методология и предмет исследования

Для изучения кросс-регуляции компонентов микробиоты и антител против SARS-CoV-2 был исследован иммунный ответ в ротовой полости и сыворотке против Spike-SARS-CoV-2 при вакцинации методом иммуноферментного анализа или при помощи цитофлуориметрического анализа. Также с помощью цитофлуориметрического анализа и секвенирования по гену *16s rRNA* (ribosomal RNA, рибосомальная РНК) был изучен и выделен в культуры ряд бактерий, распознаваемых антителами против Spike-SARS-CoV-2. Механизм молекулярной мимикрии установлен при использовании методик молекулярной биологии, включая вестерн-блот, масс-спектрометрический анализ, клонирование и др. Определение способности бактерий *S. salivarius* к индукции антител против Spike-SARS-CoV-2 проводилось при помощи *in vivo* экспериментов по иммунизации мышей выделенными белками, бактериями с последующим инфицированием вирусом SARS-CoV-2, а также с помощью клинического исследования с пробиотическим штаммом *S. salivarius* K12.

Кросс-регуляция *A. muciniphila* с иммунной системой слизистой оболочки кишечника и ее роль в индукции IgA при нарушенной толерантности к глюкозе изучались с использованием модели диеты HGD (20 % глюкозы) на мышях дикого типа или *Tlr4*^{-/-}. Состав микробиоты оценивался путем секвенирования по гену *16s rRNA*. Изучение свойств IgA-антител производилось с использованием иммунофлуоресцентного анализа тканей, анализа вестерн-блотом и иммуноферментного анализа. Антигены, распознаваемые аутореактивными IgA-

антителами, определялись с использованием методов молекулярной биологии, таких как вестерн-блот, масс-спектрометрический анализ, клонирование и др.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Изменение состава микробиоты людей при вакцинации против SARS-CoV-2 выражается в обогащении *S. salivarius*, что также ассоциировано с индукцией антител против белка Spike вируса SARS-CoV-2 в слюне.
2. Отдельные компоненты микробиоты экспрессируют на поверхности молекулярные мимики RBD-домена (Receptor-binding domain, рецептор-связывающий домен) белка Spike вируса SARS-CoV-2.
3. Применение бактерий, экспрессирующих белки, молекулярно схожие с белком Spike, выполняет защитную роль в мышинной модели заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2, а также способствует индукции антител против Spike-белка вируса SARS-CoV-2 у вакцинированных людей.
4. Изменения микробиоты, происходящие при нарушенной толерантности к глюкозе у мышей, ассоциированы с индукцией IgA-антител, которые перекрестно реагируют с антигенами поджелудочной железы и с компонентами микробиоты.

Степень достоверности результатов

Полученные научные результаты воспроизводимы и достоверны. Экспериментальная работа проводилась на современном сертифицированном оборудовании с использованием химических реактивов известных и надежных производителей (Sigma, Thermo Scientific, Illumina, Bio-Rad и др.). Экспериментальные модели заболеваний, а также статистическая обработка данных, приведенные в работе, соответствуют общепризнанным международным стандартам.

Апробация результатов

Результаты работы были представлены и обсуждены на международных и отечественных конференциях и научных школах: European Congress of Immunology, 2024 г., Дублин, Ирландия; Cell Symposia Mucosal Immunology: Immunity at the barriers, 2024 г., Пекин, Китай; 18th Spring School on Immunology, Этталь, Германия, 2023 г.; В Cell-T Cell Collaboration: Regulation and Dysregulation (T4), Keystone Symposia, апрель 2022 г., Гановер, Германия; Немецко-российский форум, 2019 г., Сириус, Сочи, Россия; Первый студенческий биохимический форум, 2018 г., Москва, Россия; Международная научная конференция «Ломоносов» 2017 г., Москва, Россия. Результаты работы были представлены на защите научно-квалификационной работы по окончании аспирантуры факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в планировании и проведении большинства экспериментов, анализе полученных данных и подготовке публикаций и текста диссертации. В работе №1 из списка публикаций соискателем была выполнена значительная часть экспериментов, анализ данных и подготовка текста к публикации. Участие авторов с равным вкладом в работе №1 расшифровано в тексте публикации: Павел Дурек проводил биоинформатический анализ данных секвенирования микробиоты; Лиза Будзински и Юстус Ниннеманн проводили сортировку и секвенирование бактерий из здоровых доноров (Рисунок 3 публикации); Марио Витковски и Штефан Ангемайр проводили сбор клинических образцов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, приложения и списка литературы, который включает 223 источника. Работа изложена на 130 страницах, содержит 44 рисунка и 8 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа посвящена изучению взаимодействия микробиоты и иммунной системы слизистых оболочек в контексте измененной диеты с преобладанием сахара, а также в контексте иммунного ответа против коронавируса SARS-CoV-2, в связи с чем была разделена на две основные части.

Кросс-регуляция иммунного ответа против Spike-белка SARS-CoV-2 и комменсальной микробиоты путем молекулярной мимикрии

В данной части определяли различные бактерии и их антигены, которые распознаются антителами против Spike-SARS-CoV-2 и способны индуцировать противовирусный иммунный ответ, а также исследовали изменение состава микробиоты при вакцинации против SARS-CoV-2.

Изменение состава микробиоты оральной полости при вакцинации мРНК-вакциной против SARS-CoV-2 ассоциировано с индукцией антител против Spike в слюне

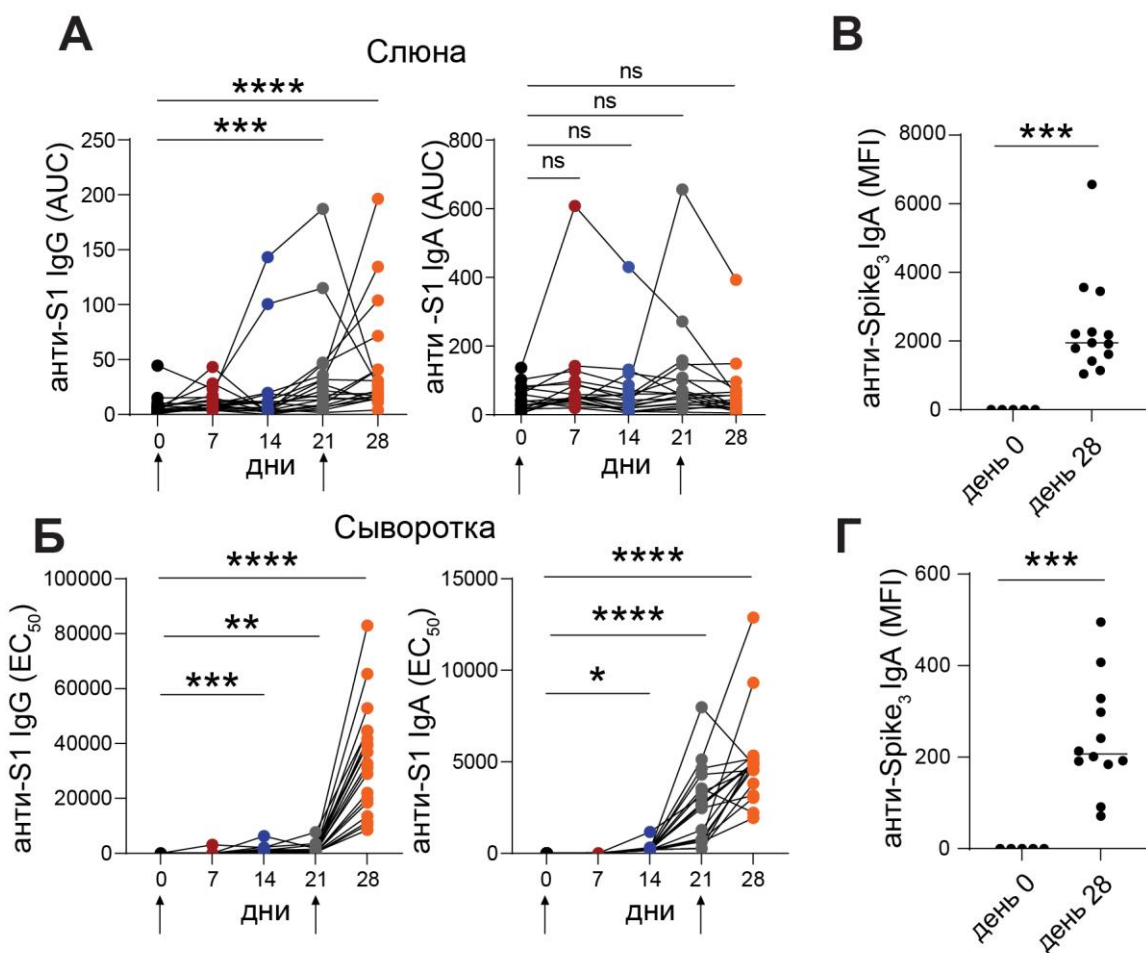


Рисунок 1. Антительный иммунный ответ в течение первого месяца после вакцинации BNT162b2. **А.** Уровни анти-S1 IgG (слева) и IgA (справа) в слюне здоровых людей, привитых вакциной BNT162b2. **Б.** Уровни анти-S1 IgG (слева) и IgA (справа) в сыворотке крови во время курса вакцинации BNT162b2. На (А и Б) вертикальными стрелками отображены дни иммунизаций (дни 0 и 21). Точки на (А) представляют значения AUC (Area under curve, площадь под кривой); точки на (Б) представляют значения EC₅₀ (Half maximal effective concentration // полуэффективная концентрация). Уровни IgG (В) и IgA (Г) в слюне против тримера Spike₃ до и после вакцинации. На графиках (В и Г) горизонтальная линия показывает медиану. В (А и Б) использовался непараметрический one-way ANOVA тест Крускалла-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. В (В и Г) использовался непарный t-тест. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$; ns – не значимо, n=12-19.

В ряде исследований были опубликованы данные о наличии антител, реактивных к RBD вируса SARS-CoV-2 у здоровых людей, не подвергавшихся воздействию вируса (Ng et al. 2020; Majdoubi et al. 2021). Мы предположили, что наличие антител в такой ситуации может определяться микробиотой. Для изучения взаимодействия антител, индуцируемых при вакцинации против SARS-CoV-2, с микробиотой в течение первого месяца после иммунизации, нами были оценены титры антител IgA (immunoglobulin A, иммуноглобулин А) и IgG против Spike-белка вируса SARS-CoV-2 в ротовой полости в течение первого месяца после первой иммунизации мРНК-вакциной BNT162b2 (Рис. 1 А). Через 7 дней после бустерной вакцинации титры IgG-антител к S1 определялись у всей когорты (Рис. 1 А).

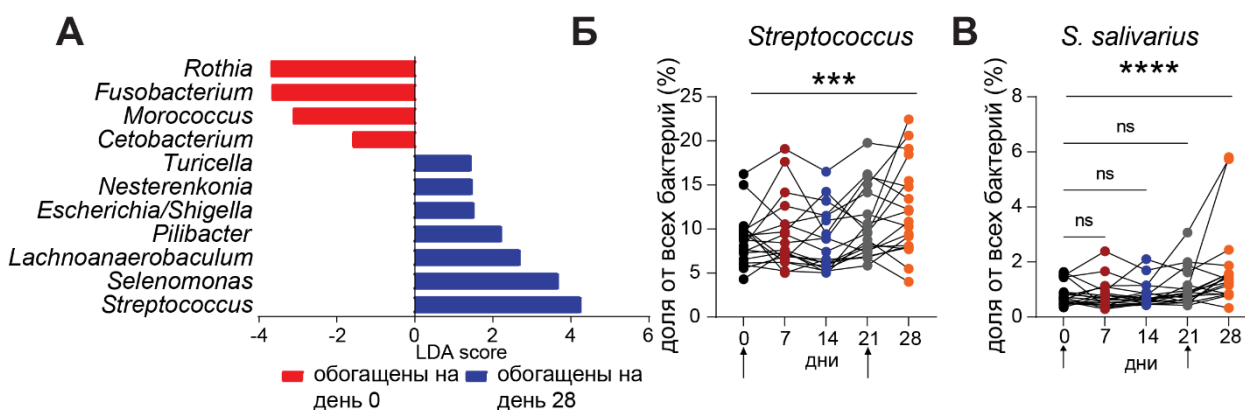


Рисунок 2. Состав микробиоты полости рта в течение первого месяца после вакцинации BNT162b2. А. LEfSe анализ (Linear discriminant analysis Effect Size, линейный дискриминантный анализ в сочетании с измерением размера эффекта) для данных *16S rRNA*, полученных из слюны вакцинированных людей представителей микробиоты ротовой полости в день 0 и в день 28 вакцинации BNT162b2 **Б.** Относительная численность рода *Streptococcus* во время вакцинации BNT162b2. **В.** Относительная численность *S. salivarius* в слюне во время вакцинации BNT162b2. Данные на **(Б)** и **(В)** представлены в виде отдельных точек до и после вакцинации; вертикальными стрелками отображены дни иммунизаций (день 0 и 21). Данные были проанализированы с помощью непараметрического one-way ANOVA теста Крускала-Уоллиса с множественными сравнения Данна. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$; ns - не значимо, n=19.

Производство специфических к S1-субъединице IgG в ротовой полости коррелировало с индукцией анти-Spike IgG-антител в сыворотке (Рис. 1 Б). Мы предположили, что спектр реактивности антител может не ограничиваться S1-субъединицей, поэтому далее нами была проверена реактивность IgA и IgG до и после вакцинации к полноразмерному Spike₃-белку с использованием транзientной трансфекции клеточной линии 293Т, плазмидой, кодирующей тример Spike₃. Нами была обнаружена реактивность IgA- и IgG-антител к тримеру Spike₃ после вакцинации, но не у наивных доноров, что следует из цитофлуориметрического анализа Spike₃-293Т-клеток (Рис. 1 В, Г). Таким образом, вакцинация мРНК-вакциной BNT162b2 приводила к появлению анти-Spike IgG и IgA в ротовой полости, что также соответствует данным (Sheikh-Mohamed et al. 2022). Мы предположили, что секретируемые на слизистую антитела против Spike, индуцируемые вакцинацией, могут способствовать изменению микробиоты. Анализ бактериального состава оральной микробиоты путем секвенирования по гену *16s rRNA* (ribosomal RNA, рибосомная РНК)

показал, что на 28-й день микробиота полости рта была обогащена родами *Pillibacter*, *Lachnoanaerobaculum*, *Seimonas* и *Streptococcus* и другими, а *Rothia*, *Fusobacterium*, *Morococcus* и *Cetobacterium* были снижены на 28-й день по сравнению с образцами до вакцинации (Рис. 2 А, Б). Дополнительная классификация родов *Streptococcus* показала, что частота *S. salivarius* значительно увеличилась в полости рта на день 28 после вакцинации у 14 из 19 участников (Рис. 2 В). Интересно, что в другой когорте пациенты с ревматоидным артритом (РА) не развивают антитела в ротовой полости против белка Spike в течение первого месяца после вакцинации (Рис. 3 А, Б). Кроме этого, анализ микробиоты оральной полости у пациентов с РА во время вакцинации показал также отсутствие прироста бактерий рода *Streptococcus* (Рис. 3 В). Таким образом, в ходе первого месяца вакцинации против SARS-CoV-2 наблюдается изменение микробиоты, выражающееся в росте бактерий *Streptococcus*, что связано с индукцией антител против Spike-белка SARS-Cov-2.

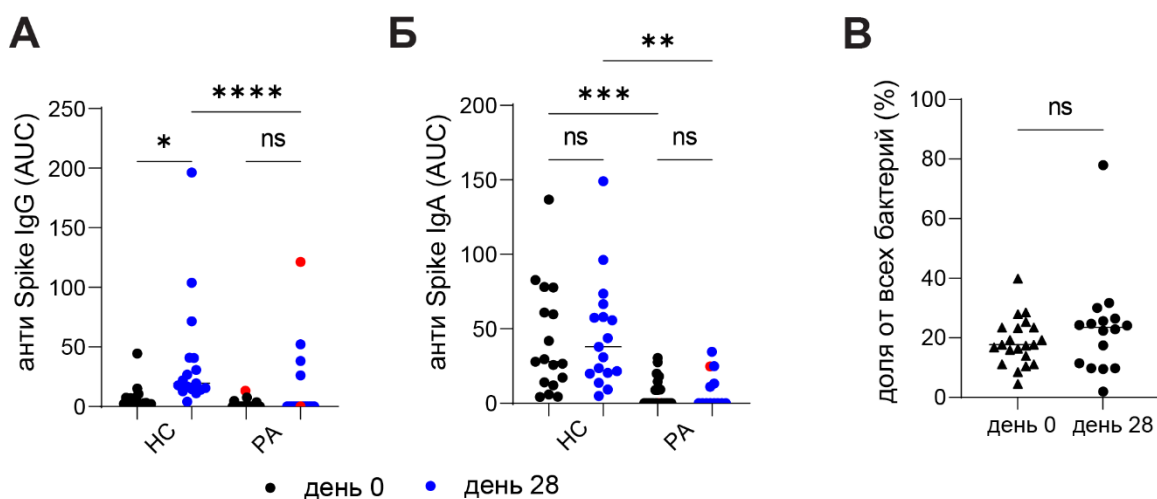


Рисунок 3. Пациенты с ревматоидным артритом не развивают антительного ответа в ротовой полости против белка Spike в течение первого месяца после вакцинации. А и Б. Анти-Spike S1 IgG и IgA соответственно в слюне до вакцинации и через 7 дней после второй вакцинации (день 28) у здоровых доноров (HC) и пациентов с РА. Ранее инфицированные SARS-CoV-2 индивидуумы показаны красным цветом. **В.** Относительная численность бактерий рода *Streptococcus* у пациентов с РА во время вакцинации против SARS-CoV-2. В (А и Б) данные были проанализированы с помощью непараметрического one-way ANOVA теста Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. Для (В) использовался непарный t-тест. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$; ns – не значимо, $n=19-23$.

Антитела против Spike-белка распознают различные компоненты микробиоты путем молекулярной мимикрии

Так как изменения в составе слюнной микробиоты после вакцинации коррелировали с индукцией антител против Spike-SARS-CoV-2, то мы предположили, что специфические антитела против Spike могут связываться с отдельными бактериями и влиять на их представленность. Для проверки этой гипотезы мы проанализировали связываемость кишечной микробиоты здоровых, невакцинированных людей нейтрализующими антителами, специфичными к домену RBD Spike-белка SARS-CoV-2 (Рис. 4 А, Б) (Kreye et al. 2020). Чтобы определить бактерии, связывающиеся с антителами против RBD, мы выделили их методом сортировки клеток с помощью FACS и определили их видовую принадлежность по *16S rRNA* (Рис. 4 А). Бактерии, меченные вторичными

антителами (анти-hIgG, анти-rabIgG), были исключены из анализа. Антитела против RBD демонстрировали специфичность к родам *Streptococcus*, *Escherichia*, *Bifidobacteria* и другим (рис. 4 Б). В ходе сортировки бактерий, связанных нейтрализующими антителами, специфичными к домену RBD Spike-белка SARS-CoV-2, часть бактерий была также получена нами в культуре с использованием разнообразных культуральных микробиологических сред (Рис. 4 А). Далее полученные клоны бактерий были идентифицированы секвенированием по Сэнгеру по гену *16s rRNA*, среди них были обнаружены также бактерии рода *Streptococcus*, *Bifidobacteria* и другие.

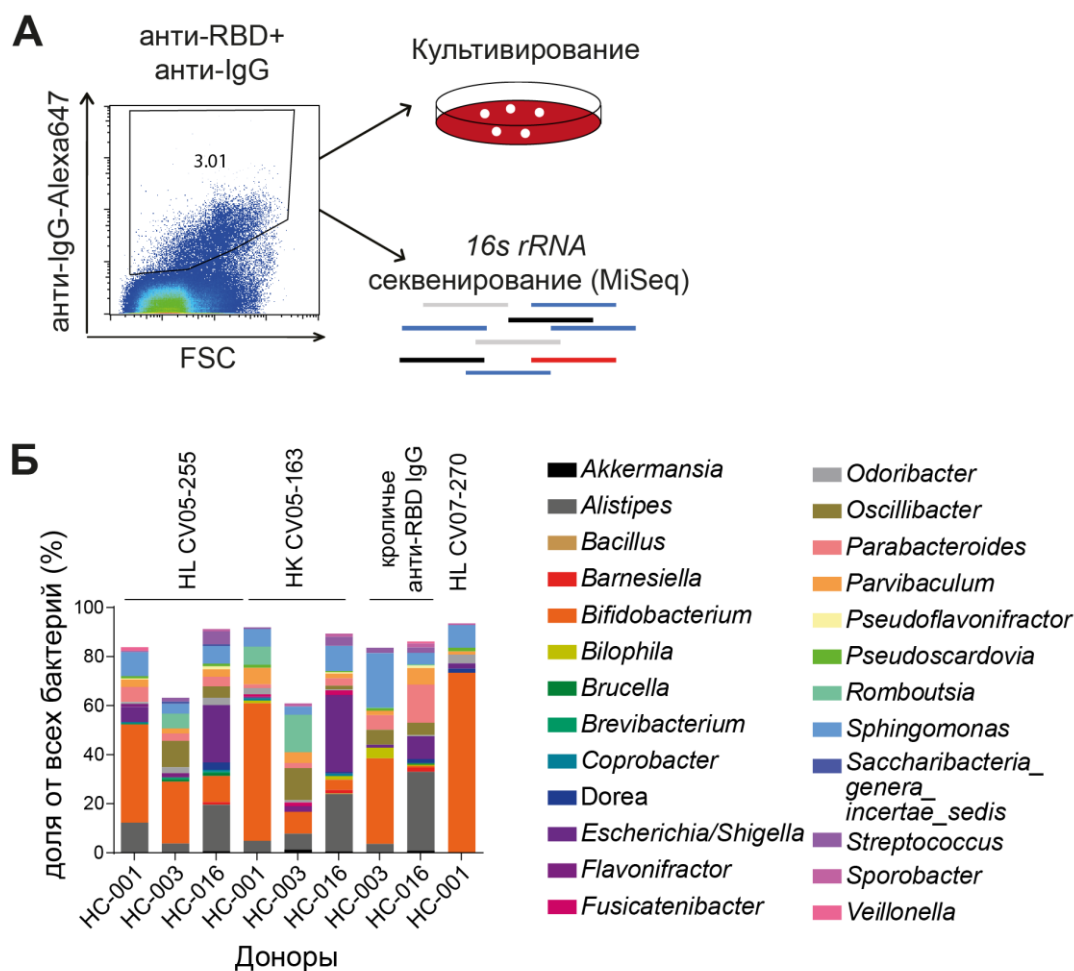


Рисунок 4. Нейтрализующие анти-RBD-антитела распознают различные комменсальные бактерии. А. Стратегия идентификации бактерий, которые связываются различными анти-RBD антителами. **Б.** Относительная численность отсортированных бактерий здоровых доноров (НС), распознаваемых анти-RBD-антителами, выделенными из пациентов с COVID-19 (HL CV05-255, HK CV05-163, HL CV07-270) и из иммунизированных RBD кроликов. Долю каждого рода рассчитывали по отношению к количеству общих прочтений. Рода, численность которых превышала 0,1 %, были отобраны для анализа, n=12.

Индукция кросс-реактивных анти-Spike-антител штаммами комменсальной микробиоты

Выявив различные бактерии, распознающиеся антителами против RBD, мы проанализировали способность этих бактерий вызывать антитела к RBD-домену SARS-CoV-2 *in vivo*. Среди выделенных бактерий (Рис. 4) далее мы сосредоточились на *S. salivarius* и *B. pseudocatenulatum*, принимая во внимание, что количество *S. salivarius* увеличивается у людей после первого месяца после

вакцинации (рис. 2 В), а количество *B. pseudocatenulatum* обратно коррелирует с развитием острого пост-COVID-19-синдрома (Coronavirus disease – 2019, коронавирусное заболевание 2019 г.) (Liu et al. 2022). Действительно, в фекалиях мышей, которых кормили как *S. salivarius* K12, так и *B. pseudocatenulatum*, были обнаружены IgA-антитела, реагирующие к RBD (рис. 5 А), которые также ингибировали связывание RBD с ACE-2, что свидетельствует о нейтрализующей способности этих RBD-связывающих антител (рис. 5Б).

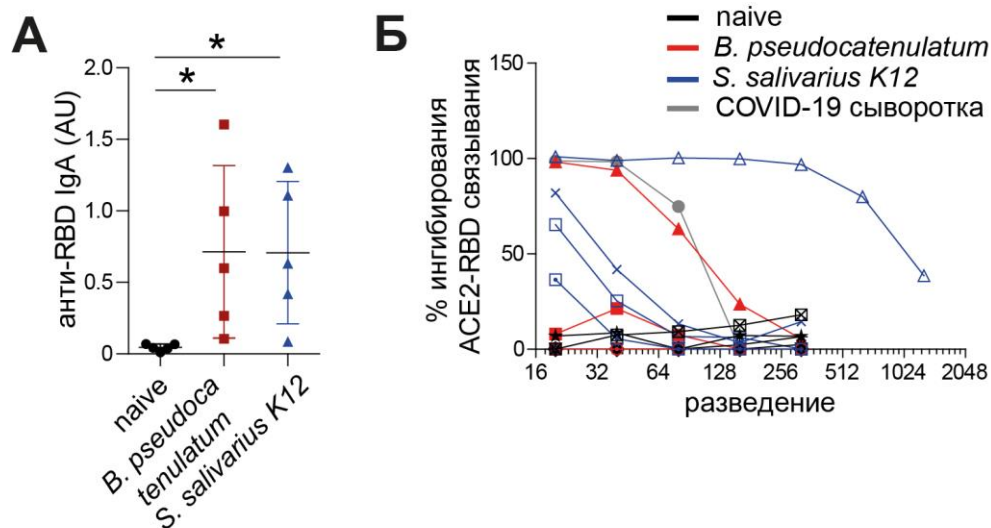


Рисунок 5. Индукция кросс-реактивного ответа против RBD SARS-CoV-2 комменсальными бактериями у мышей дикого типа. **А.** Индукция IgA-ответа в кишечнике против RBD путем перорального введения живых бактерий. Мышам перорально вводили суспензию бактерий в буфере PBS каждый второй день. **Б.** *In vitro* ингибирование связывания ACE-2 с RBD супернатантами фекалий мышей из (А). В качестве положительного контроля была использована сыворотка пациента с COVID-19. Данные в (А) представлены как среднее \pm SD. Каждая линия на рисунке (Б) представляет один образец. Для анализа (А) использовался непараметрический one-way тест ANOVA Крускалла-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; ns - не значимо, $n=5$, графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

Для определения бактериальных белков, мимикрирующих под RBD, мы проанализировали лизаты выделенных бактерий на связывание анти-RBD-антителами методом вестерн-блот (Рис. 6А, В). Было установлено, что данные антитела распознают белок молекулярной массой примерно 75 кДа в случае *S. salivarius* (Рис. 6 А), тогда как для *B. pseudocatenulatum* — белок примерно 70 кДа (Рис. 6 В). Дальнейший масс-спектрометрический анализ выявил данные белки: белок RSSL_01370, который по природе является декстрансукразой, и белок-транспортер олигопептидов OppA1. Последующее клонирование в вектор и оверэкспрессия данных белков подтвердила, что именно эти белки распознаются антителами против RBD-Spike-белка SARS-CoV-2 (Рис. 6 Б, Г). Иммунизация белком RSSL_01370 и белком OppA1 мышей дикого типа приводила к индукции системного IgG-ответа против S1-домена Spike-белка SARS-CoV-2 (Рис. 7 А, Б). Это свидетельствует о том, что данные бактериальные белки могут индуцировать кросс-реактивные антитела против Spike-SARS-CoV-2 *in vivo*. Интересно, что в одном из исследований, где изучали различия в составе микробиоты верхнего респираторного тракта и метаболические пути микробиоты у пациентов с легким и тяжелым течением COVID-19, было показано, что декстрансукраза

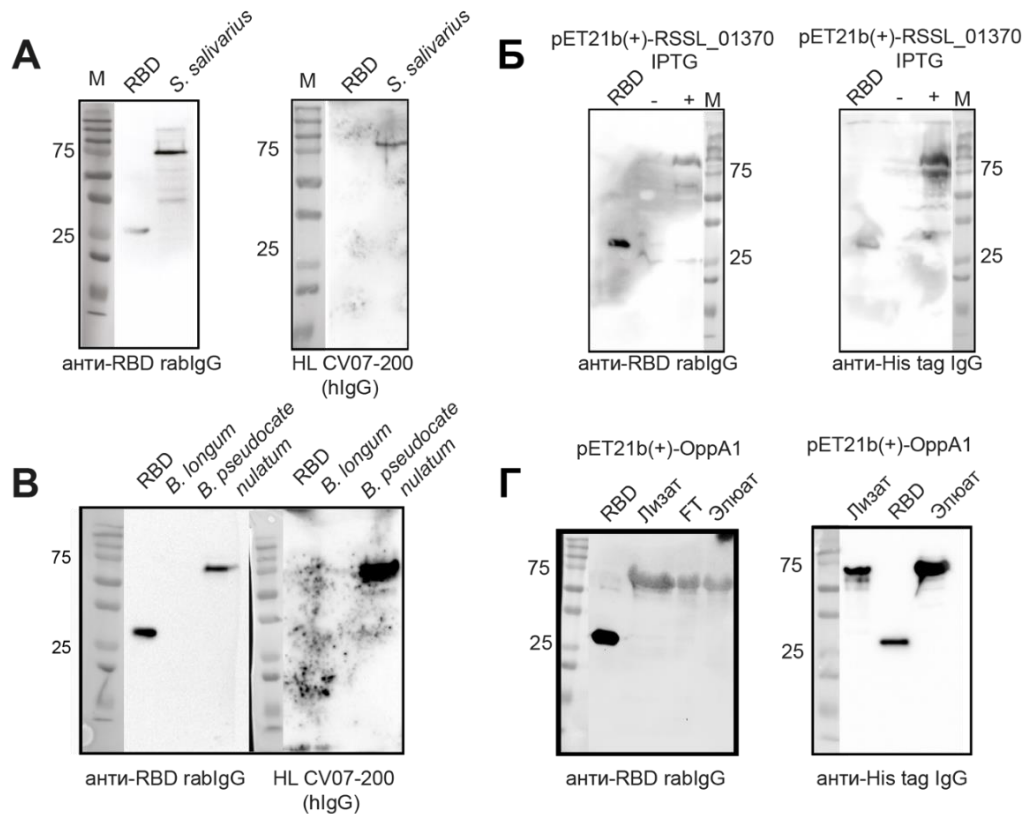


Рисунок 6. Комменсальные бактерии экспрессируют на поверхности антигены, мимикрирующие под RBD, которые распознаются различными нейтрализующими антителами против SARS-CoV-2. (А) Вестерн-блот анализ связывания кроличьих анти-RBD и человеческих HL CV07-200 с лизатом *S. salivarius*, полученным из микробиоты человека. (Б) Вестерн-блот анализ связывания кроличьего анти-RBD с белком RSSL-01370 *S. salivarius*, сверхэкспрессированным в *E. coli*. (В) Вестерн-блот анализ связывания кроличьих анти-RBD и человеческих HL CV07-200 с лизатами *B. longum* и *B. pseudocatenulatum*, полученными из микробиоты человека. (Г) Вестерн-блот анализ связывания кроличьего анти-RBD с белком OppA1 *B. pseudocatenulatum*, сверхэкспрессированным в *E. coli*. Оверхэкспрессию клонированных в вектор pET21b(+) белков оценивали по окрашиванию мембраны антителами против His-tag (рисунки справа на Б, Г). Во всех экспериментах использовали рекомбинантный SARS-CoV-2 RBD-His-Tag в качестве положительного контроля, графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

ассоциирована с более легким течением болезни (Galeeva et al. 2024). Эти данные подтверждают, что различные симбиотические микроорганизмы могут экспрессировать белки, которые мимикрируют под RBD вируса SARS-CoV-2. На следующем этапе нами было изучено, как предварительная иммунизация бактериями *S. salivarius* K12 и *B. pseudocatenulatum* влияет на проявление симптомов заболевания вирусом SARS-CoV-2. Для этого K18-hACE2 Tg мыши (трансгенные мыши, экспрессирующие человеческий рецептор ACE-2 под контролем K18 промотора) были дважды проиммунизованы данной бактериальной смесью и через 7 дней после повторной иммунизации подвергались инфицированию вирусом SARS-CoV-2 B1.1 с TCID50 10^4 (Tissue culture infectious dose, инфекционная доза культуры тканей 50 %) (Kozlovskaya et al. 2021). В качестве положительного контроля была использована группа мышей, которая до инфицирования была проиммунизована вакциной CoviVac (Рис. 8 А). Интересно, что нами был отмечен ускоренный процесс очистки вируса из легких (Рис. 8 Б, В), хотя общее течение заболевания не показало значительного улучшения (данные не показаны), подтверждая, что кросс-реактивные антитела играют важную роль в элиминации вируса из организма.

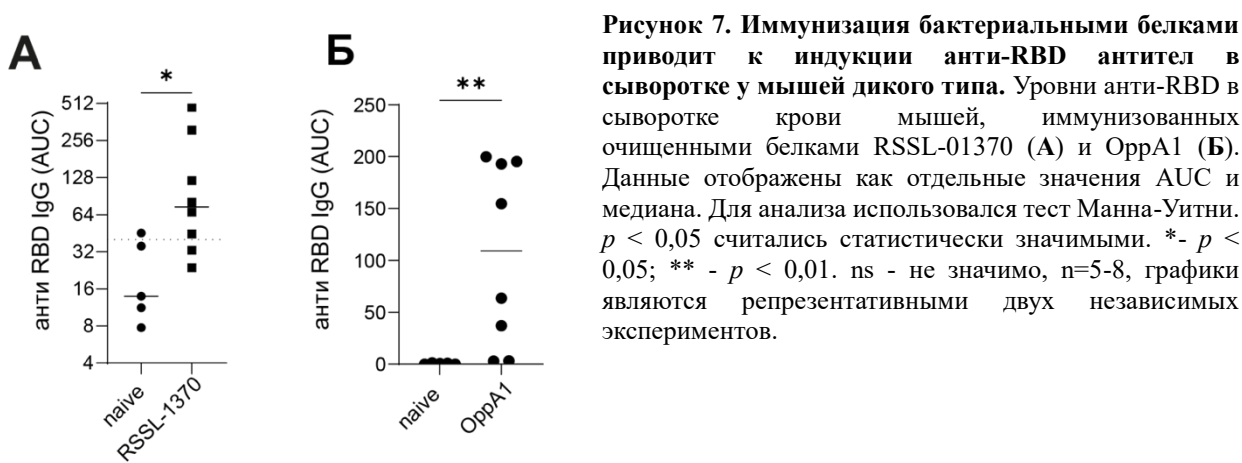


Рисунок 7. Иммунизация бактериальными белками приводит к индукции анти-RBD антител в сыворотке у мышей дикого типа. Уровни анти-RBD в сыворотке крови мышей, иммунизированных очищенными белками RSSL-01370 (А) и OppA1 (Б). Данные отображены как отдельные значения AUC и медиана. Для анализа использовался тест Манна-Уитни. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$. ns - не значимо, $n=5-8$, графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

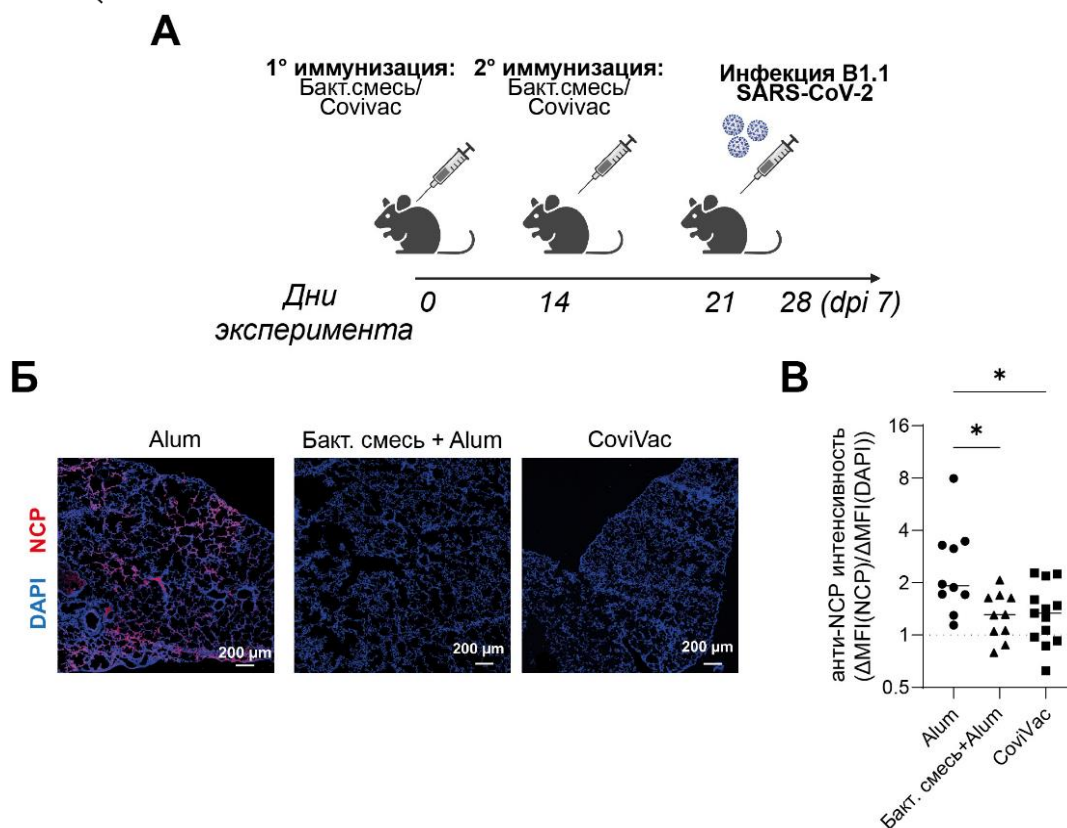
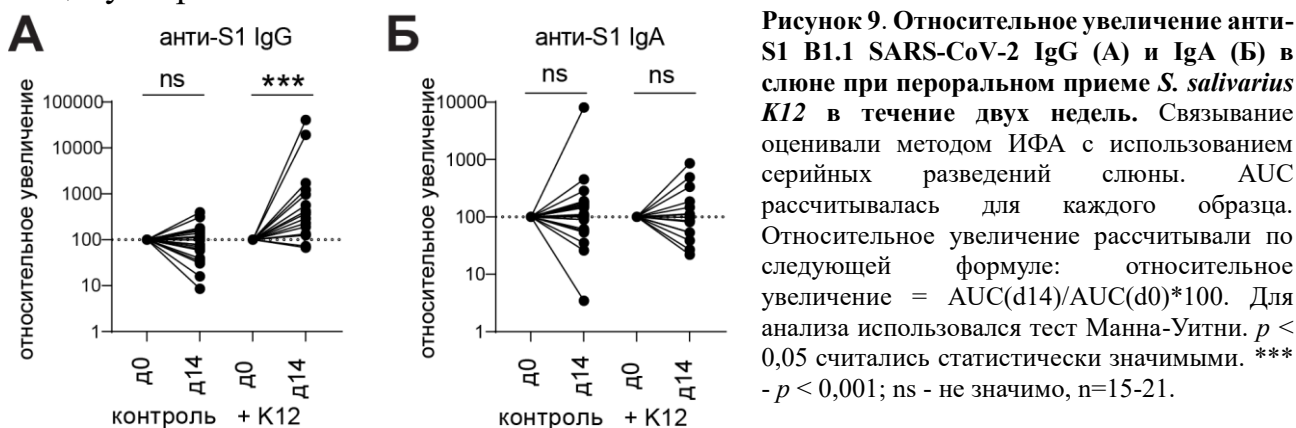


Рисунок 8. Иммунизация мышей *S. salivarius* K12 и *B. pseudocatenuatum* с последующим инфицированием вирусом B1.1 SARS-CoV-2 способствует ускоренной элиминации вируса из легких. А. Иммунофлуоресцентный анализ на белок NCP (nucleocapsid protein, нуклеокапсидный белок) в легких мышей K18-hACE2 Tg, инфицированных B1.1 SARS-CoV-2, на 7-й день после заражения. Б. Статистический анализ интенсивностей окрашивания белка NCP в легких мышей B1.1 SARS-CoV-2, инфицированных K18-hACE2 Tg, на 7-й день после заражения. Для анализа использовался непараметрический one-way ANOVA тест Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; ns - не значимо, $n=10-13$.

Далее мы проанализировали, влияет ли пероральный прием пробиотика *S. salivarius* BLIS K12 на уровень специфических антител к Spike-белку у вакцинированных ранее доноров. Для этого вакцинированные доноры, у которых последняя вакцинация была проведена не менее чем за три месяца до включения в исследование, получали перорально 10^7 КОЕ *S. salivarius* K12 ежедневно в течение двух недель. Было показано, что прием *S. salivarius* BLIS K12 в течение

двух недель вызвал значительное повышение уровня анти-S1 IgG, чего не наблюдалось в контрольной группе (Рис. 9). Эти данные свидетельствуют о том, что пероральный прием *S. salivarius* BLIS K12 может стабилизировать и увеличить в течение двух недель концентрацию специфических IgG-антител в ротовой полости вакцинированных BNT162b2 людей. Тем не менее, необходимы дополнительные исследования с более длительным периодом наблюдения и большим числом участников, чтобы определить устойчивость этого кросс-взаимодействия микробиоты и антител в долгосрочной перспективе, а также оценить защитный потенциал от инфицирования вирусом SARS-CoV-2 или защиту от развития тяжелых симптомов заболевания.



Таким образом, нами было показано, что отдельные бактерии микробиоты оральной полости участвуют в регуляции мукозального иммунитета против SARS-CoV-2 посредством молекулярной мимикрии RBD Spike-белка SARS-CoV-2, и что они поддерживают локальную продукцию Spike-специфичных IgG-антител (Рис. 10).

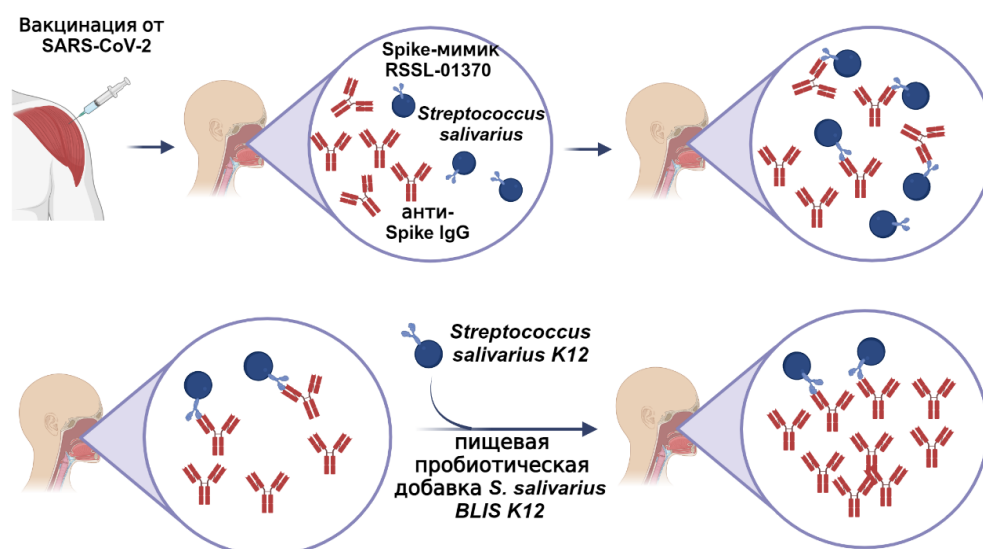


Рисунок 10. Предполагаемый механизм взаимодействия между *Streptococcus salivarius* и иммунной системой через Spike-специфичные антитела. Верхняя линия: при вакцинации против SARS-CoV-2 происходит индукция Spike-специфичных антител, что ассоциировано с увеличением роста *S. salivarius* полости рта. На поверхности *S. salivarius* присутствует молекулярный мимик RBD — RSSL-01370, который распознается анти-Spike-антителами. Нижняя линия: доноры, ранее вакцинированные против SARS-CoV-2, при получении пищевой пробиотической добавки *S. salivarius* BLIS K12 амплифицируют IgG-антитела против Spike SARS-CoV-2.

Кросс-регуляция микробиоты и мукозальной иммунной системы посредством антител в контексте диеты с повышенным содержанием глюкозы

В ходе второго этапа работы изучали изменение состава микробиоты при диете с повышенным содержанием глюкозы, определяли механизмы индукции и специфичность IgA-антител при такой диете.

Повышенное содержание глюкозы в диете приводит к развитию нетолерантности к глюкозе и к повышению продукции IgA через TLR4-зависимый путь

Взаимодействие между иммунной системой слизистых оболочек и населяющими ее микроорганизмами может зависеть от внешних факторов, которые могут определять кросс-регуляцию между компонентами за счет изменения роста тех или иных представителей микробиоты или влияния на иммунный ответ. Так, ранние исследования на людях показали положительную взаимосвязь между наличием сахарного диабета второго типа и уровнем IgA в сыворотке (Rodriguez-Segade et al. 1996). Однако механизм индукции такого IgA не был предложен. Так как IgA-антитела являются одним из механизмов, контролирующих состав микробиоты, вторая часть данного исследования была посвящена изучению роли диеты с высоким содержанием глюкозы (HGD) во взаиморегуляции микробиоты и иммунной системы. Такая модификация диеты приводила к нарушению толерантности к глюкозе (Рис. 11).

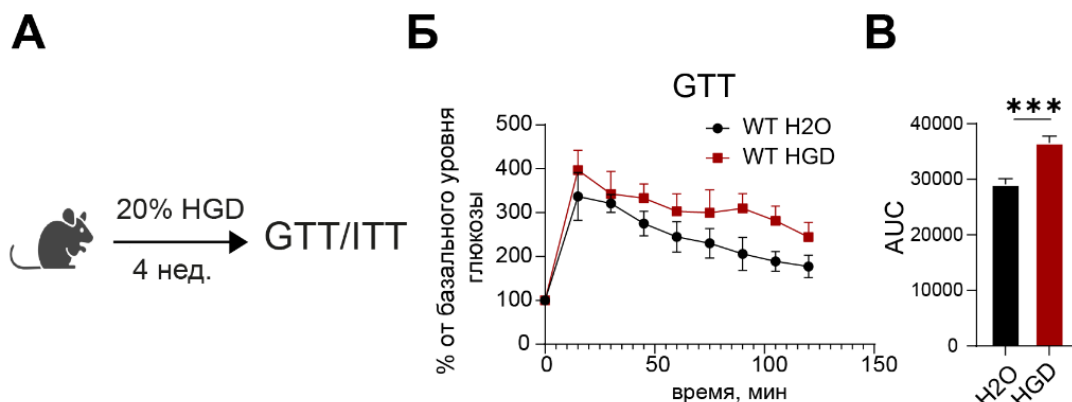


Рисунок 11. Повышенное содержание глюкозы в диете приводит к развитию нетолерантности к глюкозе. А. Схема модели HGD. Б. Глюкозотолерантный тест (GTT) у мышей после HGD по сравнению с мышами контрольной группы (H2O). В. Анализ площади под кривой (AUC) результатов на (Б). Для анализа (В) использовался непарный t-тест. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. *** - $p < 0,001$, $n=5-8$, графики являются репрезентативными трех независимых экспериментов.

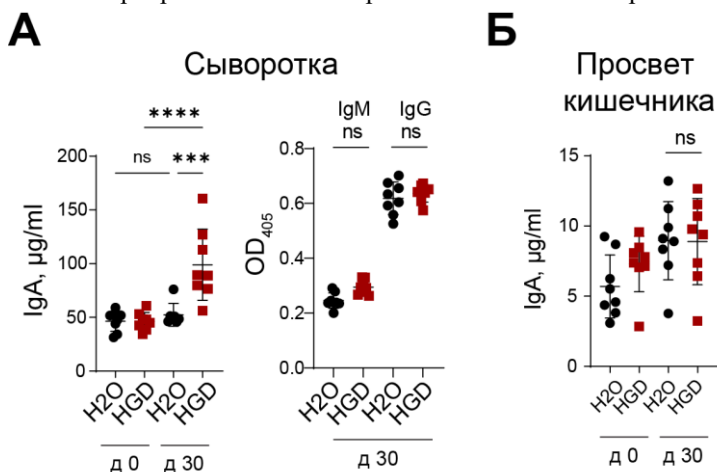


Рисунок 12. Уровень IgG- и IgM- антител в сыворотке после HGD не меняется. (А) ИФА уровня IgA, IgM и IgG в сыворотке до и после HGD (день 0 и день 30). (Б) ИФА уровня свободного IgA в просвете кишечника после HGD (день 30). Для анализа использовался непараметрический one-way ANOVA тест Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. *** - $p < 0,001$; ns - не значимо, $n=5-8$, графики являются репрезентативными трех независимых экспериментов.

Последующее измерение уровня IgA, IgM и IgG в сыворотке и свободного IgA в просвете кишечника методом иммуноферментного анализа (ИФА) выявило, что такая диета приводила к усиленной продукции IgA в сыворотке, при этом содержание IgM и IgG не изменялось при потреблении HGD (Рис. 12 А). Интересно, что уровень свободного IgA в кишечнике не возрастал у группы HGD, как в сыворотке (Рис. 12 Б).

Исходя из важности TLR4 в развитии метаболического синдрома, мы предположили, что TLR4-сигнальный путь может участвовать в регуляции продукции IgA при нарушенной толерантности к глюкозе (Jia et al. 2014; Manolakis et al. 2011). Чтобы проверить данную гипотезу, мыши с делецией гена *Tlr4* были подвержены 4-недельной диете HGD. Оказалось, что *Tlr4*^{-/-} мыши оказались устойчивы к развитию нарушения толерантности к глюкозе (Рис. 13 А, Б). Таким образом, мы выяснили, что TLR4 важен при нарушении метаболизма глюкозы. Более того, ИФА сыворотки мышей дикого типа и *Tlr4*^{-/-} выявил, что *Tlr4* важен для увеличения IgA в сыворотке (Рис. 13 В). Из этого следует, что TLR4 как регулирует повышение IgA в сыворотке, так и опосредует индукцию нетолерантности к глюкозе.

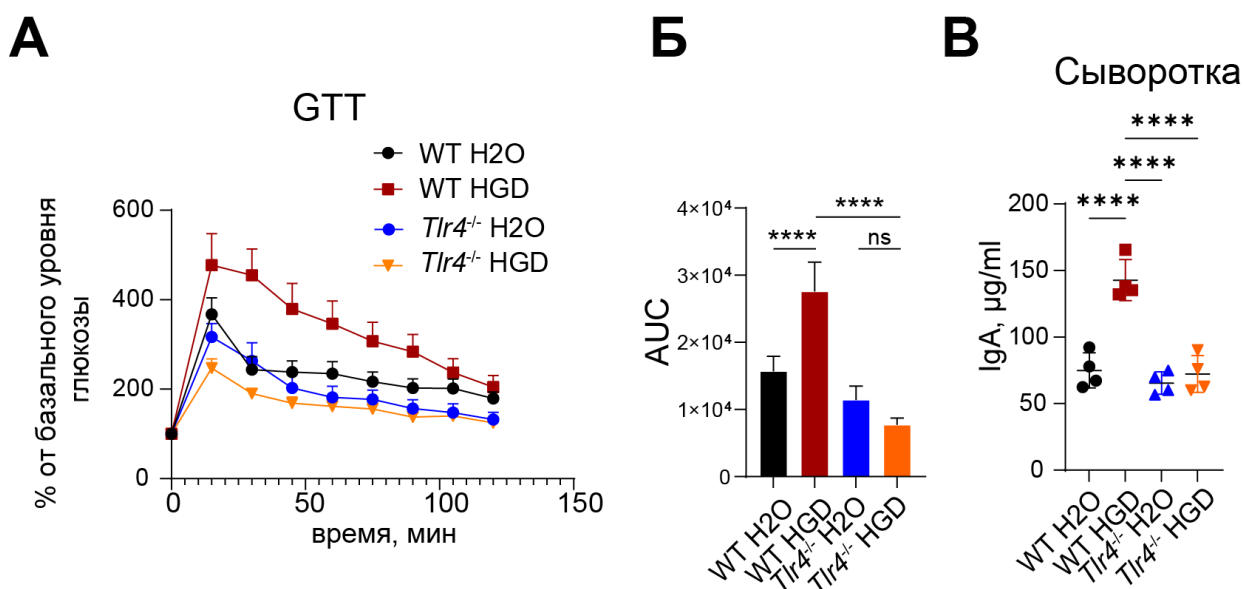


Рисунок 13. Мыши с делецией гена *Tlr4* не развивают нарушения толерантности к глюкозе и повышенного IgA при HGD. (А) Глюкозотолерантный тест (GTT) у мышей дикого типа (WT) и *Tlr4*^{-/-} после HGD по сравнению с мышами контрольной группы (H2O). (Б) Анализ кривых GTT методом подсчета площади под кривой (AUC). В. ИФА уровня IgA в сыворотке после HGD у мышей дикого типа (WT) и *Tlr4*^{-/-} после HGD по сравнению с мышами контрольной группы (H2O). Для анализа использовался непараметрический one-way ANOVA тест Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. **** - $p < 0,0001$; ns - не значимо, $n=4$, графики являются репрезентативными трех независимых экспериментов.

Диета с высоким содержанием глюкозы приводит к дисбалансу микробиоты кишечника и изменяет распознавание микробиоты IgA-антителами

Для анализа влияния диеты на состав микробиоты далее было проведено секвенирование по гену 16s *rRNA* микробиоты кишечника мышей дикого типа после HGD. Выяснилось, что HGD приводила к изменениям в составе микробиоты кишечника, где анализ LEfSe показал, что на уровне родов являются

обогащенными *Akkermansia*, *Parasutterella*, *Allobaculum*, *Brucella* и другие, тогда как доля таких родов как *Rikenella*, *Desulfovibrio*, *Clostridium XIVa* и других снижена (Рис. 14). Представленность каждого из семейств/родов бактерий микробиоты может отвечать как за развитие метаболического синдрома, так и за изменение продукции IgA. Интересно, что *Akkermansia* была одной из наиболее обогащенных бактерий (Рис. 14, 15 А).

Как уже упоминалось выше, комменсальные бактерии могут вызывать IgA-антительный ответ, который может быть направлен как на организм хозяина, так и на саму бактерию. В свою очередь, покрытие IgA-антителами бактерий может регулировать их нахождение в просвете кишечника и контакт с эпителием.

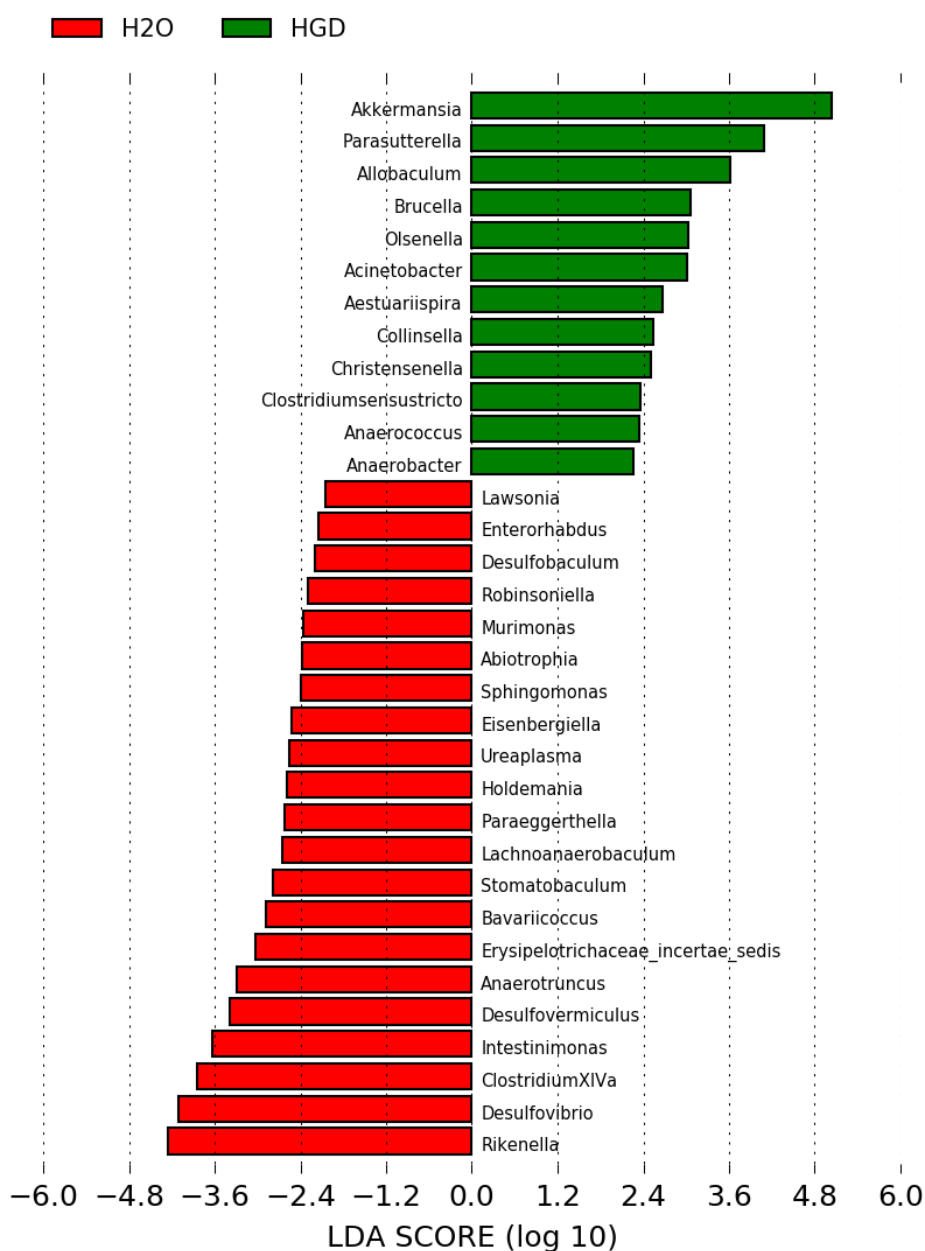


Рисунок 14. HGD изменяет состав микробиоты. Оценки LDA представителей микробиоты кишечника на уровне родов у мышей после HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H2O). Был проведен линейный дискриминантный анализ (LDA) в сочетании с измерением размера эффекта (LEfSe) для данных *16S rRNA*. n=8, график является суммирующим двух независимых экспериментов.

Поэтому для дальнейшего изучения реактивности IgA-антител к микробиоте в контексте HGD мы отсортировали IgA-покрытые бактерии из фекалий мышей после HGD и провели анализ состава микробиоты данной фракции. Выяснилось, что при HGD *Akkermansia* не только повышена в своем содержании среди компонентов микробиоты, но и еще обогащена именно среди IgA-покрытых бактерий (Рис. 15 Б). Из этого можно предположить, что *Akkermansia* индуцирует IgA-антитела при HGD.

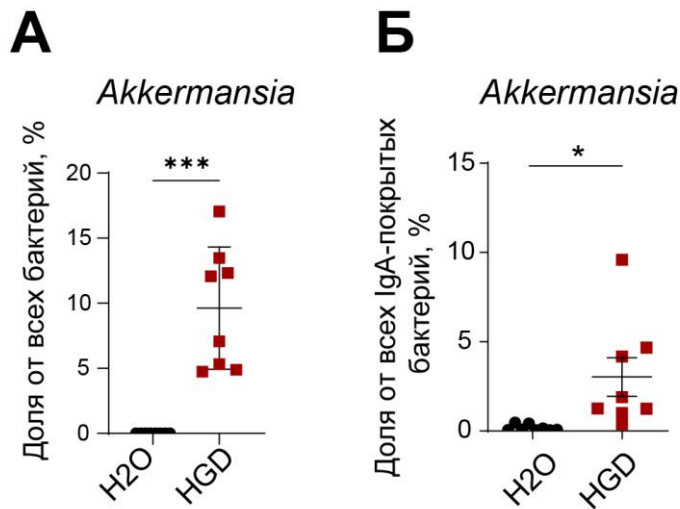


Рисунок 15. HGD изменяет состав микробиоты, приводя к разрастанию *Akkermansia*, и увеличивает ее распознавание IgA-антителами. **А.** Относительное содержание рода *Akkermansia* после HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H2O). **Б.** Относительное содержание рода *Akkermansia* после HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H2O) среди IgA-покрытых бактерий. Данные представлены в виде отдельных точек со средним \pm SD. Для анализа использовался непарный t-тест * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$; ns - не значимо, $n=8$, графики являются суммирующими двух независимых экспериментов.

HGD-IgA-антитела, распознающие бактерию рода *Akkermansia*, представлены в организме на системном уровне и могут таргетировать различные антигены организма-хозяина за счет молекулярной мимикрии. На данный момент уже опубликован ряд работ, где было выяснено, что иммунный ответ, индуцируемый против конкретных микроорганизмов, может таргетировать собственные ткани или другие микроорганизмы (Gil-Cruz et al. 2019; Rollenske et al. 2018; Miyauchi et al. 2020; Girdhar et al. 2022). В данной модели HGD также приводила к индукции IgA-антител, которые распознавали как антигены *A. muciniphila*, так и антигены поджелудочной железы (Рис. 16 А, Б). Более того, аутореактивность IgA-антител регулировалась TLR4-рецептором, поскольку у мышей с делецией *Tlr4* не наблюдалось окрашивания на срезах поджелудочной железы (Рис. 16 Б). Чтобы проверить кросс-реактивность данных HGD-IgA-антител между *A. muciniphila* и поджелудочной железой, мы провели эксперимент с предварительной блокировкой сыворотки, содержащей HGD-IgA, нативным лизатом *A. muciniphila* (Рис. 16 В). Преинкубация с бактериальными антигенами приводила к уменьшению связывания IgA-антител с поджелудочной железой (Рис. 16 Г). Это подтверждает тот факт, что антитела, индуцируемые HGD, являются кросс-реактивными.

Таким образом, HGD приводит к нарушению глюкозотолерантности и изменяет состав микробиоты кишечника, где ввиду обилия глюкозы начинает процветать *Akkermansia*. Далее *Akkermansia* вызывает иммунный ответ против себя, где IgA-антитела продуцируются в форме димера в большом количестве. Эти антитела далее секретируются в просвет кишечника и связывают

Akkermansia. При этом IgA кросс-реагируют к тканям организма-хозяина, в частности к поджелудочной железе (Рис. 19). Продукция кросс-реактивных аутореактивных IgA-антител зависит от TLR4-пути.

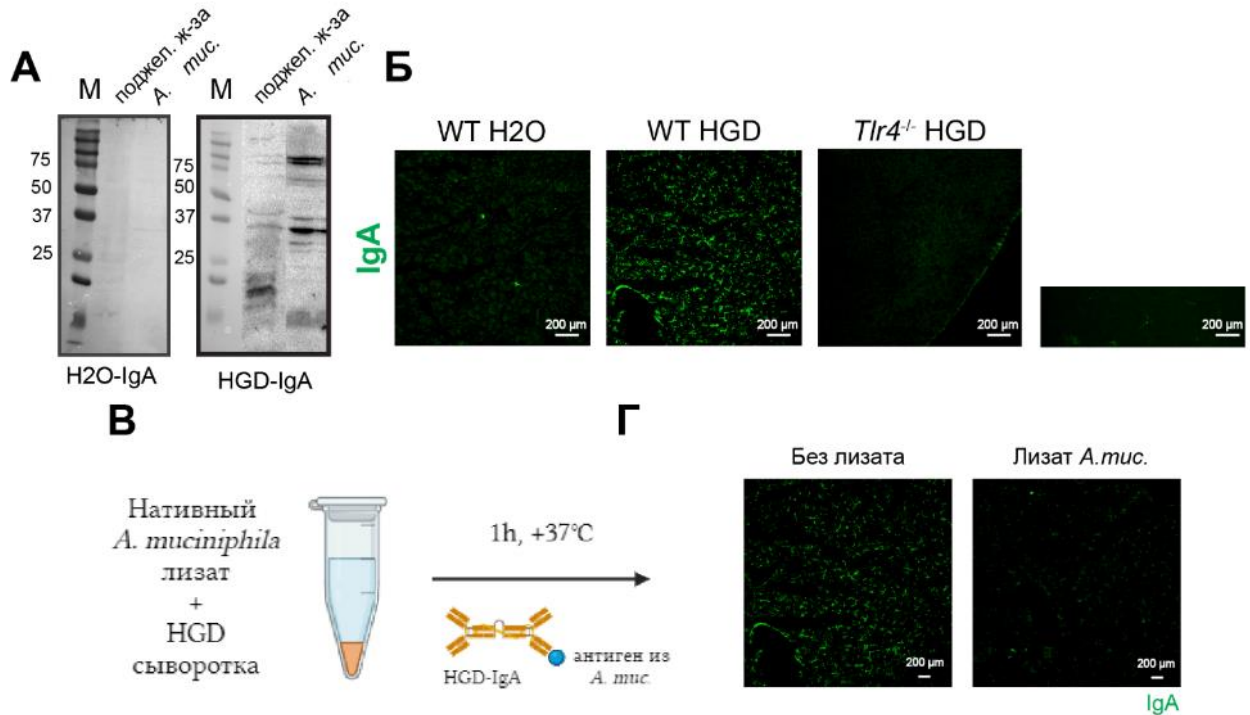


Рисунок 16. IgA-антитела против *A. muciniphila*, индуцируемые во время HGD, кросс-реагируют с тканью поджелудочной железы, и это зависит от TLR4-пути. А. Анализ реактивности IgA-антител из сыворотки мышей после HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H2O) с лизатом *A. muciniphila* (*A. mus.*) и с лизатом поджелудочной железы мыши WT при помощи вестерн-блоттинга. Б. Анализ реактивности IgA-антител из сыворотки мышей WT и мышей с делецией *Tlr4* (*Tlr4*^{-/-}) после 30 дней HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H2O). В. Схема предварительной блокировки IgA-антител из сыворотки мышей дикого типа после HGD с предварительной блокировкой нативным лизатом *A. muciniphila*. Г. Анализ реактивности IgA-антител из сыворотки мышей дикого типа после HGD с предварительной блокировкой нативным лизатом *A. muciniphila* к ткани поджелудочной железы. Графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

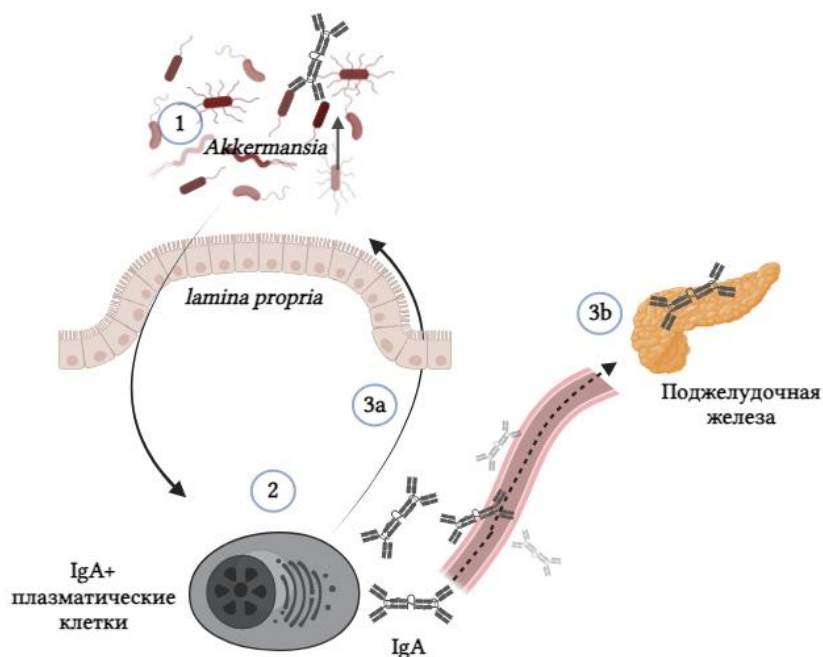


Рисунок 17. Предполагаемый механизм молекулярной мимикрии между *A. muciniphila* и поджелудочной железой в контексте диеты с повышенным содержанием глюкозы. 1) HGD приводит к изменениям в составе микробиоты, выражающимся в процветании *Akkermansia*. 2) *Akkermansia*, представленная в большей доле, способствует индукции IgA-антител плазматическими клетками тонкого кишечника. 3) IgA-антитела, индуцируемые диетой HGD, являются кросс-специфичными, поскольку реагируют к самой *Akkermansia* и другим бактериям (3a), а также к ткани поджелудочной железы (3b).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами было изучено взаимодействие между микробиотой и иммунной системой организма-хозяина в контексте диеты с повышенным содержанием глюкозы, а также в контексте антивирусного иммунного ответа.

В частности, диета с повышенным содержанием глюкозы приводила к нарушению глюкозотолерантности и изменяла состав микробиоты кишечника, где происходило обогащение представителями рода *Akkermansia*. Далее *Akkermansia* вызывала индукцию IgA-антител, которые, секретирясь в просвет кишечника, связывались с *Akkermansia* и с другими компонентами микробиоты. При этом IgA кросс-реагировали с тканями организма-хозяина, в частности с поджелудочной железой. Продукция кросс-реактивных аутореактивных IgA-антител зависела от TLR4-пути. Эти данные свидетельствуют о том, что *Akkermansia* играет важную роль в развитии толерантности к глюкозе.

Кроме этого, нами был показан новый пример, когда антигены бактериальной микробиоты являются ресурсом кросс-специфичного иммунного ответа, в частности, *S. salivarius* вызывал продукцию кросс-специфичных антител против Spike-белка SARS-CoV-2. Эти данные дополняют представление о том, что микробиота — ценный резервуар антигенов, которые могут способствовать протективному или патогенному кросс-иммунному ответу. Также нами была определена причина, по которой люди, не подвергавшиеся заболеванию SARS-CoV-2, имели на слизистых антитела к данному вирусу.

По результатам работы были сформулированы следующие **выводы**:

1. Вакцинация против SARS-CoV-2 способствует индукции Spike-специфичных IgA- и IgG-антител на системном уровне и в ротоносоглотке, а также изменяет состав микробиоты слизистых оболочек ротоносоглотки, но не кишечника, приводя к увеличению относительного содержания *S. salivarius*.
2. Антитела, специфичные к Spike-SARS-CoV-2, являются реактивными к компонентам микробиоты, таким как *S. salivarius*, *B.pseudocatenumulatum*, *B. longum* и другим.
3. Бактерии, распознающиеся антителами против SARS-CoV-2, способны индуцировать антительный ответ против Spike *in vivo* и способствуют ускоренной элиминации коронавируса SARS-CoV-2 из легких у мышей K18-hACE2 Tg.
4. Диета HGD способствует развитию нарушенной толерантности к глюкозе, приводит к повышению продукции IgA-антител в сыворотке, а также изменяет состав микробиоты кишечника, увеличивая рост *A. muciniphila*.
5. IgA-антитела, индуцируемые HGD, образуются по TLR4-зависимому пути и перекрестно реагируют с различными антигенами поджелудочной железы и с антигенами *A. muciniphila*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus или РИНЦ:

1. **M. Bondareva***, L. Budzinski*, P. Durek*, M. Witkowski*, S. Angermair*, J. Ninnemann*, J. Kreye, P. Letz, M. Ferreira-Gomes, I. Semin, G. Guerra, S. Momsen Reincke, E. Sánchez-Sendin, S. Yilmaz, T. Sempert, G. Heinz, C. Tizian, M. Raftery, G. Schönrich, D. Matyushkina, I. Smirnov, V. Govorun, E. Schrezenmeier, A. Stefanski, T. Dörner, S. Zocche, E. Viviano, N. Klement, K. Sehmsdorf, A. Lunin, H. Chang, M. Drutskaya, L. Kozlovskaya, S. Treskatsch, A. Radbruch, A. Diefenbach, H. Prüss, P. Enghard, M. Mashreghi, A. Kruglov. Cross-regulation of antibody responses against the SARS-CoV-2 Spike protein and commensal microbiota via molecular mimicry. // *Cell Host and Microbe*. – 2023. – V. 31, No. 11. – P. 1866-1881. Импакт-фактор WoS (JIF) = 20.6 (3,1185/0,3)**.
2. **M. Bondareva**, P. Letz, K. Karberg, E. Schrezenmeier, I. Semin, H. Rincon-Arevalo, T. Dörner, M. Mashreghi, A. Stefanski, A. Kruglov. Induction of cross-reactive, mucosal anti-SARS-CoV-2 antibody responses in rheumatoid arthritis patients after 3rd dose of COVID-19 vaccination. // *Journal of Autoimmunity*. – 2022. – V. 133, No. Dec. – P. 102918. Импакт-фактор WoS (JIF) = 7.9 (0,8/0,5).
3. Н. Шаранова, J. Ninnemann, **М. Бондарева**, Я. Семин, А. Номоконова, А. Круглов. Анализ специфичности IgA-антител, продуцируемых в тонком кишечнике мышей. // *Молекулярная биология*. – 2017. – Т. 51, № 6. – С. 938-944. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ = 1,191 (0,693/0,25).

N. Sharanova, **M. Bondareva**, Y. Semin, A. Nomokonova, A. Kruglov, J. Ninnemann. Analysis of specificity of IgA antibodies produced in murine small intestine. // *Molecular Biology*. – 2017. – V. 51, No. 6. – P. 813-818. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ = 1,191 (0,693/0,25).
4. I. Semin, J. Ninnemann, **M. Bondareva**, I. Gimaev, A. Kruglov. Interplay between microbiota, Toll-Like Receptors and cytokines for the maintenance of epithelial barrier Integrity. // *Frontiers in Medicine*. – 2021, – V. 8, No. Feb. – P. 644333. Импакт-фактор WoS (JIF) = 3.1 (0,924/0,25).

* Равноценный вклад в работу

** В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.

