

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



**Домнин Павел Александрович**

**Моделирование и изучение свойств не прикрепленных к  
поверхности бактериальных агрегатов**

1.5.11. Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена в лаборатории экологии возбудителей инфекций ФГБУ "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России и на кафедре биоинженерии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научные руководители (консультанты)** – *Ермолаева Светлана Александровна, доктор биологических наук*  
*Лобакова Елена Сергеевна, доктор биологических наук, доцент*
- Официальные оппоненты** – *Потехина Наталья Викторовна – доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра микробиологии, ведущий научный сотрудник*  
*Гриценко Виктор Александрович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ОФИЦ УрО РАН), Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, лаборатория персистенции и симбиоза микроорганизмов, главный научный сотрудник*  
*Гончаренко Анна Владимировна – кандидат биологических наук, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, отдел медицинской микробиологии, группа редактирования геномов микроорганизмов, руководитель группы, старший научный сотрудник*

Защита диссертации состоится «13» февраля 2024 г. в 17 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1

Тел. 8(495)939-35-46, e-mail: [nvkostina@mail.ru](mailto:nvkostina@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/015.2/2814>

Автореферат разослан «26» декабря 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета МГУ.015.2, к.б.н.



Костина Н.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

В медицинской микробиологии принято считать, что патогенные бактерии в организме больного существуют в двух состояниях: одиночные плавающие планктонные клетки и ассоциированные с поверхностью клеточные агрегаты, известные как биопленки. Бактериальные биопленки – прикрепленные к поверхности трехмерные многослойные структуры, образованные бактериями и продуцируемым ими внеклеточным матриксом, состоящим из экзополисахаридов, экзоферментов, внеклеточной ДНК и липидов. Механизмы защиты, обеспечиваемые биопленками, такие как: поддержание гомеостаза среды в биопленке, ограничение диффузии антибиотиков, реорганизация макромолекул (экзоферментами), гетерогенность бактериальных клеток в популяции, в том числе клеток-персистеров, обеспечивают в сотни раз более высокую устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды по сравнению с одиночными планктонными клетками (Høiby et al., 2010, Steward et al., 2001, Walters et al., 2003). На сегодняшний день биопленки остаются серьезной проблемой при лечении хронических инфекций (Alhede et al., 2011, Stoodley и др., 2008).

Развитие методов микроскопии позволило проводить анализ биопленок *ex vivo* и *in vivo* в образцах, полученных из слизистых оболочек и эпителиальных тканей, суставов и хронических ран. Было выявлено, что во многих случаях биопленки при хронических заболеваниях не были напрямую связаны с поверхностями тканей человека, а скорее «плавали» в объеме физиологических жидкостей. Такие неприкрепленные агрегаты, образованные бактериями, внедренными в полимерный матрикс, описаны для широкого круга патогенных бактерий, включая токсигенные *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter* spp., и ряд других патогенных бактерий (Alhede et al., 2011, Stoodley et al., 2008). Характерным свойством этих неприкрепленных агрегатов является то, что, в связи со спецификой поведения патогенных бактерий в организме больного, они состоят преимущественно из клеток штамма возбудителя. Такие агрегаты называются автоагрегатами, в противовес коагрегатам, сформированным сообществом из разных штаммов и видов микроорганизмов. Взвешенные бактериальные коагрегаты хорошо известны специалистам в области экологии микроорганизмов, изучающим микробные экосистемы природных водоемов и донных отложений (Passow, 2002b; Busch et al., 2017; Zäncker et al., 2019; Gernaey and Sin, 2008).

Для изучения свойств неприкрепленных бактериальных агрегатов в последние годы появляется все больше моделей *in vitro*. Мониторинг агрегации бактерий в культурах без встряхивания в высоковязких средах, в блоках агара или в присутствии физиологических жидкостей показал, что неприкрепленные агрегаты имеют ряд общих характеристик с прикрепленными к поверхности биопленками, включая наличие внеклеточного матрикса, потребность в размножении бактерий и повышенную устойчивость к противомикробным препаратам (Hall et al., 2017). С другой стороны, такие особенности, как состав матрикса и механизмы молекулярно-

генетической регуляции, могут различаться между неприкрепленными агрегатами и классическими биопленками. Основным техническим ограничением для моделей неприкрепленных агрегатов *in vitro* является седиментация агрегатов под действием гравитационной силы даже в высоковязких средах, что ограничивает время наблюдения. Поэтому необходима разработка моделей для изучения бактериальной агрегации, в особенности автоагрегации возбудителей инфекционных заболеваний.

**Цель работы:** апробировать модель автоагрегации бактерий, основанную на феномене магнитной левитации, на примере ряда патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, разработать методы исследования бактериальных автоагрегатов с использованием новой модели и определить различия в механизмах формирования биопленок и автоагрегатов, а также особенности фенотипа бактерий в автоагрегатах.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Подобрать оптимальные условия для культивирования бактериальных автоагрегатов в новой экспериментальной системе, основанной на феномене магнитной левитации (магнитном биопринтере) и сравнить со стандартными моделями автоагрегации
2. Используя разработанную экспериментальную систему, охарактеризовать особенности формирования автоагрегатов у ряда вирулентных и сапрофитических штаммов *Escherichia coli* в сравнении с особенностями формирования биопленок этими штаммами
3. Изучить механизмы генетического контроля автоагрегации вирулентного штамма *E. coli* серотипа O157:H7
4. Провести сравнительный анализ протеома бактерий, выращенных в условиях магнитной левитации и в условиях невесомости в космосе

**Научная новизна и практическая значимость:**

1. Апробирована новая модель не прикрепленных к поверхности бактериальных агрегатов, основанная на феномене магнитной левитации, позволяющая изучать различия в эффективности автоагрегации бактерий (например, влияние точечных мутаций в генах, регулирующих автоагрегацию), которые не дифференцируются стандартными моделями
2. Обнаружены различия в механизмах контроля формирования биопленок и автоагрегатов у патогенных и сапрофитических штаммов *E. coli*
3. Продемонстрирован вклад регулятора транскрипции гетеродимера RcsB/RcsA в автоагрегацию патогенных *E. coli* серотипа O157:H7
4. Обнаружено сходство в протеоме *E. coli* M17, выращенных в новой модели бактериальной автоагрегации (магнитной левитации) и в условиях микрогравитации в космосе

**Объекты и методология исследования**

В работе исследован феномен бактериальной автоагрегации с использованием магнитного биопринтера для создания условий магнитной левитации. Полученные бактериальные автоагрегаты были охарактеризованы с точки зрения морфологии, механизмов формирования и протеомных характеристик бактериальных клеток в

составе автоагрегатов. Объектами исследования выступили грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes*, и грамотрицательные *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Характеристику бактериальных автоагрегатов и используемых в экспериментах бактерий проводили с помощью микробиологических, микроскопических и молекулярно-генетических методов, а также с помощью омиксных технологий. Из микробиологических методов применялись прямые высевы из бактериальных автоагрегатов с последующим подсчетом КОЕ, оценка формирования биопленок в лунках 96-луночных полистироловых планшетов с последующей окраской кристалвиолетом, оценка формирования белков-курлей на агаре с окрашиванием конго красным, оценка автоагрегации бактерий с помощью седиментационного теста, оценка подвижности бактерий в толще полужидкого агара, оценка устойчивости к антибиотикам диско-диффузионным методом и методом серийных разведений. Также был применен оригинальный метод оценки автоагрегации в магнитном биопринтере с помощью связывания автоагрегатами конго красного.

Помимо микробиологических методов морфология бактериальных автоагрегатов изучалась с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Помимо микроскопии проводился замер геометрических параметров автоагрегатов.

Среди молекулярно-генетических методов применялись полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование ДНК с анализом последовательностей ДНК с помощью программы BioEdit, ДНК-электрофорез в агарозном геле, ДНК-лигирование, электропорация, рестрикция.

Для оценки изменений физиологии бактерий в автоагрегатах использовался протеомный анализ, проведенный на базе ИБХФ РАН с использованием базы данных KEGG.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Разработана новая модель бактериальной агрегации, позволяющая изучать различия в эффективности автоагрегации бактерий (например, влияние точечных мутаций в генах, регулирующих автоагрегацию), которые не дифференцируются стандартными моделями
2. Продемонстрирована независимость механизмов, контролирующих формирование биопленок и автоагрегатов у *E. coli*: показано, что штаммы, хорошо формирующие биопленки, могут плохо автоагрегировать и хорошо автоагрегирующие штаммы могут не формировать биопленки
3. Установлено, что регулятор транскрипции гетеродимер RcsA/RcsB контролирует процесс автоагрегации патогенной *E. coli* O157:H7, не влияя на способность этих бактерий формировать биопленки

4. Продемонстрировано сходство в протеоме *E. coli*, выращенных в условиях магнитной левитации и микрогравитации, в особенности поверхностных белков и белков, регулирующих обмен углеводов

#### **Степень достоверности**

Достоверность результатов, представленных в работе, определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований, комплексным применением современных методов исследования и подтверждается статистической обработкой полученных данных.

#### **Апробация результатов**

Материалы и результаты диссертации были представлены на 3 российских и 1 международных конференциях: XXVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2020», 3-й Российский Микробиологический Конгресс, X Российский форум биотехнологий “Площадка открытых коммуникаций OpenBio” и FEMS-2023. Основные результаты были опубликованы в 4 статьях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, в том числе 3 из них в изданиях Q1.

#### **Личное участие автора в получении результатов**

Личное участие автора в получении результатов состояло в анализе опубликованных в научной литературе данных, постановке экспериментов, обработке и интерпретации результатов, представлении и апробации результатов на конференциях, подготовке научных публикаций по выполненной работе, написании текста диссертации. Основные результаты работы получены автором самостоятельно. Разработка дизайна и сборка магнитных биопринтеров выполнена 3D Bioprinting Solutions, Ltd. Микроскопические исследования (КЛСМ и СЭМ) проводились совместно с к.б.н., в.н.с. кафедры высшей нервной деятельности Мойсенович А.М. и к.б.н., в.н.с. лаборатории конфокальной микроскопии Архиповой А.Ю. Протеомный анализ выполнен совместно с к.ф.-м.н., с.н.с. лаборатории масс-спектрометрии биомакромолекул Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук Кононихиным А. С. Секвенирование образцов ДНК произвели в ЦКП “ГЕНОМ”.

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 4 статьи, среди них 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 140 страницах, содержит 6 таблиц и 22 рисунка и состоит из следующих разделов: 1) введение, 2) обзор литературы, 3)

материалы и методы, 4) результаты, 5) обсуждение, 6) заключение, 7) выводы, 9) список цитируемой литературы (258 источников).

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Выражаю глубокую благодарность помощь и поддержку в проведении данной работы, важные рекомендации научным руководителям д.б.н. Ермолаевой Светлане Александровне и д.б.н., доц. Лобаковой Елене Сергеевне.

Выражаю глубокую благодарность сотрудникам лаборатории экологии возбудителей инфекции отдела природно-очаговых инфекций ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи с.н.с., к.м.н. Чаленко Ярославе Михайловне, в.н.с., к.б.н. Сысолятиной Елене Владимировне, н.с. Калинин Егору Валерьевичу, н.с. Абдулкадиевой Марьям Махдиевне и л.-и. Захарченко Анастасии Евгеньевне за помощь в проведении микробиологических и молекулярно-генетических исследований, поддержку и ценные советы, а также в.н.с., д.б.н. Пушкаревой Валентине Ивановне за предоставленный штамм *E. coli* ATCC 43890.

Выражаю глубокую благодарность компании «3D Bioprinting solutions» за предоставленные магнитные биопринтеры.

Выражаю глубокую благодарность сотрудникам Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова в.н.с. кафедры высшей нервной деятельности, к.б.н. Мойсенович Анастасии Михайловне, в.н.с. лаборатории конфокальной микроскопии, к.б.н. Архиповой Анастасии Юрьевне и м.н.с. лаборатории конфокальной микроскопии Рамоновой Алле Аликовне за помощь в проведении КЛСМ и СЭМ.

Выражаю благодарность к.ф.-м.н., с.н.с. Центра по научным и инженерным вычислительным технологиям для задач с большими массивами данных Сколковского института науки и технологий Кононихину Алексею Сергеевичу за помощь в проведении протеомного анализа.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Введение. Во введении изложены актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Формулируется цель и задачи исследования.

Обзор литературы. В обзоре литературы описан феномен бактериальной автоагрегации, роль автоагрегации в экологии и медицине, молекулярные механизмы автоагрегации, методы исследования и существующие экспериментальные модели автоагрегации, а также применение феномена магнитной левитации в науке и медицине.

Материалы и методы. Приведены сведения об устройстве экспериментальной системы, основанной на феномене магнитной левитации, перечислены используемые в исследовании штаммы бактерий, описаны условия их культивирования, микробиологические, молекулярно-генетические методы, методы визуализации бактериальных автоагрегатов и методы статистической обработки данных.

## Основные результаты исследования и обсуждение

### Описание системы и принцип работы

В работе была использована система под названием «магнитный биопринтер», разработанная «3D Bioprinting Solutions, Ltd» (Parfenov et al., 2018). Магнитный биопринтер представляет собой пару постоянных неодимовых магнитов, приложенных вплотную друг к другу южными полюсами и зафиксированных с помощью металлического каркаса. В центре конструкции из магнитов есть канал для размещения емкости со средой. Также сбоку с противоположных сторон имеются круглые окошки для наблюдения за ходом эксперимента и визуального контроля при совершении манипуляций с культурой в биопринтере (рис. 1). За счет конфигурации магнитов внутри объема среды, помещенной в устройство, формируется воронкообразный градиент магнитного поля. В точке минимального градиента магнитного поля – магнитной ловушке – происходит скопление диамагнитных объектов, в том числе бактерий. Т.к. в биопринтере используются постоянные, а не сверхпроводимые магниты, то их магнитной индукции недостаточно, чтобы удерживать клетки в состоянии магнитной левитации. Поэтому в питательную среду добавлялся гадобутрол – вещество, обладающее парамагнитными свойствами и используемое в медицине при проведении магнитно-резонансной терапии (МРТ).

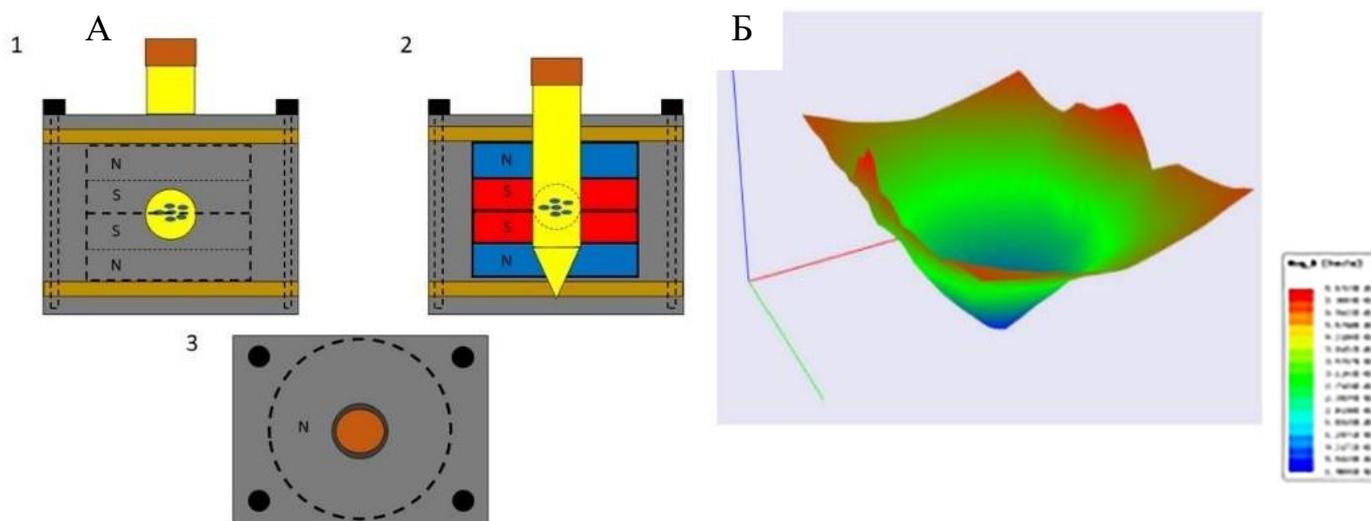


Рис. 1. Схема магнитного биопринтера. А – общий вид биопринтера (1 – вид сбоку, 2 – вид в продольном разрезе, 3 – вид сверху), Б – график, демонстрирующий градиент магнитного поля в среде

Для первоначального определения ответа бактериальной культуры на помещение в неоднородное магнитное поле, стационарную культуру штамма *E. coli* O157:H7 ATCC 43890, выращенную в течение 24 ч в среде, содержащей 0.2 М гадобутрол, поместили в магнитный биопринтер и наблюдали за изменениями в плотности распределения бактерий в объеме жидкости в течение 24 ч. Спустя 2 ч наблюдений началось перемещение бактерий в направлении центра объема среды, совпадающего с точкой минимума магнитного поля, периферическая часть при этом становилась прозрачной. Концентрация бактерий продолжилась, и спустя 24 ч в районе магнитной ловушки сформировался плотный бактериальный агрегат диаметром 4 мм и высотой 10 мм (рис. 2А). В следующем эксперименте концентрация гадобутрола была снижена до 0,1 М. В данных условиях бактерии сформировали

аналогичный агрегат несколько большего диаметра (8 мм) и смещенный ко дну емкости со средой (рис. 2Б).

Изучен рост бактерий в условиях магнитной левитации. Для этого сравнили поведение 4 штаммов патогенных бактерий в магнитном биопринтере: грамположительные *S. aureus* штамм ATCC 25923 и *L. monocytogenes* штамм EGDe, грамотрицательные *P. aeruginosa* штамм 2943 и использованный ранее *E. coli* штамм ATCC 43890. Стационарные культуры бактерий были разведены в 100 раз свежей средой LB с 0,2 М гадобутрола, помещены в магнитный биопринтер и инкубировались при 37°C в течение 24 ч. После инкубации в магнитной ловушке наблюдалось образование бактериальных агрегатов (рис. 2В). При использовании в протоколе экспериментов гадобутрола в концентрации 0,1 М бактериальные агрегаты опускались на дно емкости под действием собственной тяжести. На основании этих результатов в последующей работе для получения автоагрегатов использовалась концентрация гадобутрола 0,2 М и время инкубации не менее 24 ч.

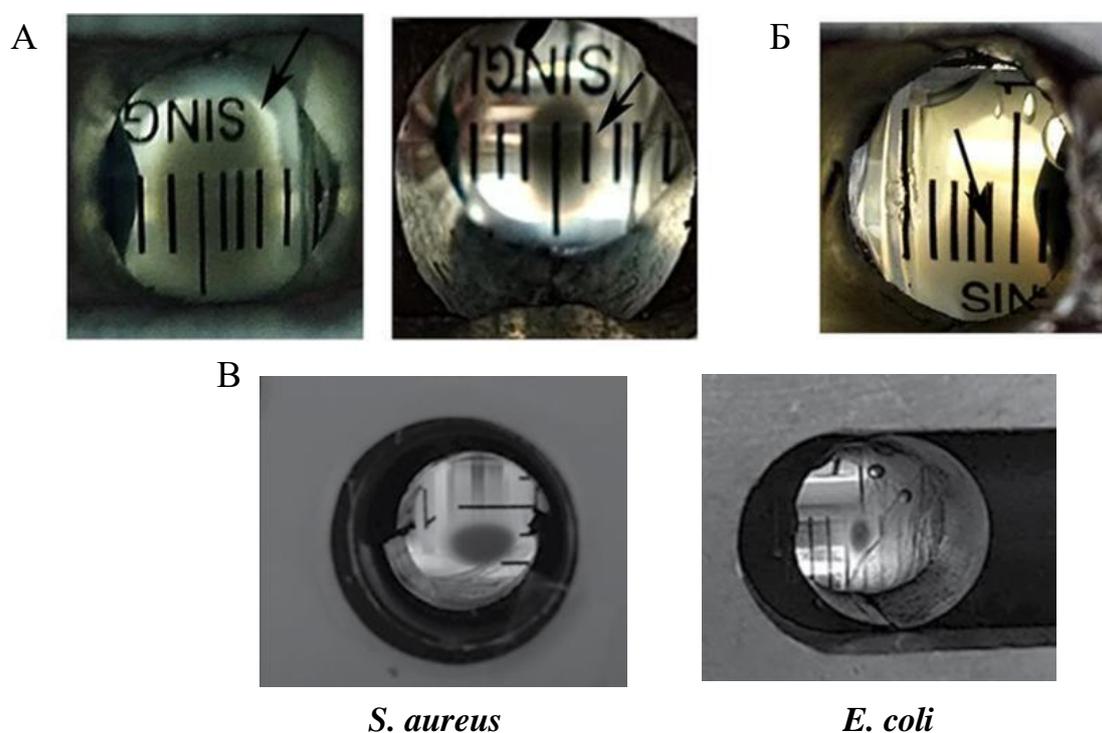


Рис. 2. Бактериальные агрегаты, сформированные бактериями в различных условиях. А – стационарная культура *E. coli* ATCC 43890 с 0,2 М гадобутрола (слева – спустя 6 ч с начала эксперимента, справа – спустя 24 ч), Б – стационарная культура *E. coli* ATCC 43890 с 0,1 М гадобутрола, В – бактериальные агрегаты, сформированные при возможности роста бактерий в биопринтере.

### **Жизнеспособность грамотрицательных и грамположительных бактерий, выращенных в магнитном биопринтере**

Анализ соотношения живых и мертвых клеток бактерий в агрегатах проводили с использованием окраски агрегатов дифференциальным красителем Live/Dead. Процент живых бактерий в агрегатах, выращенных в течение 72 часов, составлял от 82% для *E. coli* до 99% для *L. monocytogenes* (Рис. 3А и 3Б).

Определена численность бактериальных клеток в агрегате и в окружающей агрегат среде. Установлено, что в прозрачной части среды, окружающей агрегат, содержится приблизительно  $3,4 \times 10^5$  КОЕ/мл после 24 ч инкубации и  $3,1 \times 10^7$  КОЕ/мл после 72 ч инкубации для *S. aureus* (0,3% и 18% от общего числа бактерий в культуре соответственно),  $1,4 \times 10^6$  КОЕ/мл после 24 ч инкубации и  $1,6 \times 10^7$  КОЕ/мл после 144 ч инкубации для *E. coli* (4,5% и 10% от общего числа бактерий в культуре соответственно). В самой же магнитной ловушке было приблизительно  $9,7 \times 10^7$  КОЕ/мл после 24 ч инкубации и  $1,4 \times 10^8$  КОЕ/мл после 72 ч инкубации для *S. aureus*,  $2,9 \times 10^7$  после 24 ч инкубации и  $1,4 \times 10^8$  КОЕ/мл после 144 ч инкубации для *E. coli* (рис. 3В).

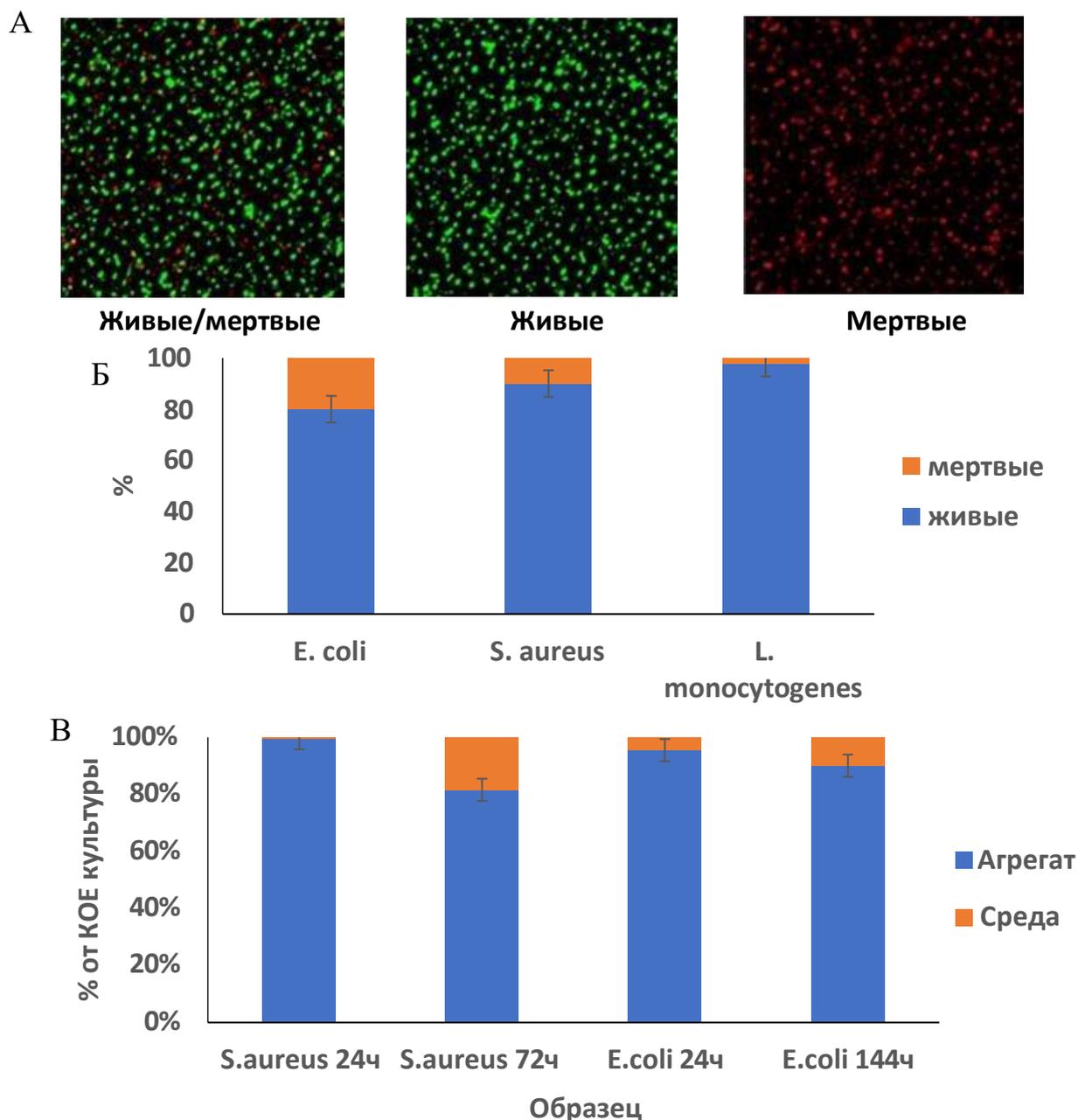


Рис. 3. Свойства бактериальных клеток в магнитном биопринтере. А – окраска агрегата, сформированного *E. coli*, красителем Live/Dead, Б – соотношение живых и мертвых клеток в агрегате для разных видов бактерий, В – соотношение КОЕ бактерий в агрегате и в среде.

## Анализ морфологии автоагрегатов *E. coli* с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)

Для исследования морфологии бактериальных агрегатов были использованы методы КЛСМ и СЭМ, используемые для характеристики морфологии биопленок. Исследование содержимого магнитной ловушки культуры *E. coli* ATCC 43890 с помощью КЛСМ выявило наличие бактериальных агрегатов в большом количестве, состоящих из бактериальных клеток (окрашены зеленым флуоресцентным красителем SYTO9) и внеклеточного матрикса (окрашены красным флуоресцентным красителем FilmTracer™ SYPRO® Ruby). Исследование с помощью СЭМ также выявило бактериальные клетки, погруженные во внеклеточный матрикс. Таким образом, содержимое магнитной ловушки представляет собой не столько единый автоагрегат, сколько скопление множества мелких бактериальных автоагрегатов, образовавшихся в большом количестве в магнитной ловушке без наличия какой-либо подложки за счет сближения бактериальных клеток под действием магнитного поля (рис. 4).

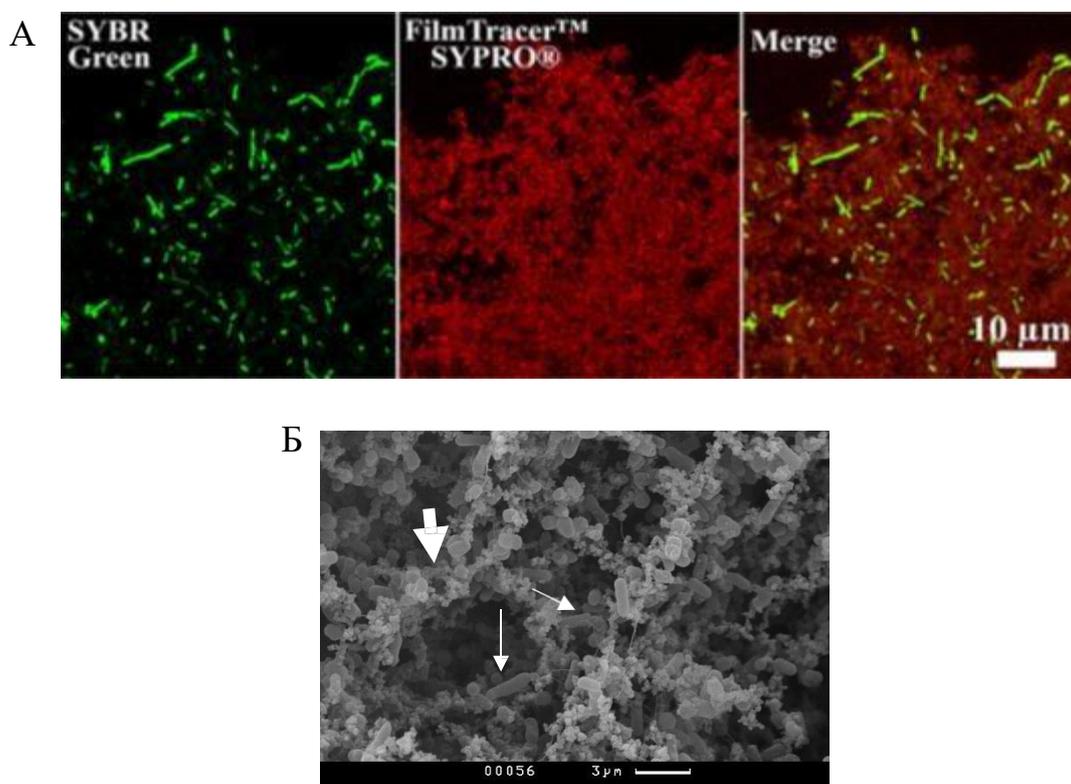


Рис. 4. Визуализация бактериальных автоагрегатов с помощью КЛСМ (А) и СЭМ (Б). Большой стрелкой обозначены тяжи внеклеточного полимерного матрикса, маленькой – бактериальные клетки

## Сравнительная характеристика автоагрегации и формирования биопленок патогенными и непатогенными штаммами *E. coli*

Проведено сравнение способности формировать биопленки и параметров автоагрегации в магнитном биопринтере для трёх штаммов *E. coli*: вирулентного штамма ATCC 43890 (серовар O157:H7), пробиотического штамма M17 и

лабораторного штамма JM109 (производный K12). Все указанные штаммы были охарактеризованы по следующим признакам: соотношение числа КОЕ в агрегате и в среде, число КОЕ бактерий на 1 мм<sup>3</sup> агрегата, формирование биопленок в лунках полистиролового планшета, а также оценка автоагрегации с помощью седиментационного теста.

Все штаммы бактерий сформировали агрегаты, однако их геометрические параметры заметно различались: самый крупный агрегат сформировал штамм JM109 (объем 283 мм<sup>3</sup>), агрегаты двух других штаммов были значительно меньше – 36 мм<sup>3</sup> для ATCC 43890 и 42,5 мм<sup>3</sup> для M17 (рис. 5А).

При подсчете числа клеток в агрегате и окружающей агрегат среде у штамма JM109 было больше всего свободноплавающих клеток в среде – 60% от общего числа клеток в культуре ( $p < 0,05$ ), у штаммов ATCC 43890 и M17 наоборот, большинство клеток находилось в агрегате, а в среде было всего лишь 5% и 10% от общего числа клеток в культуре, соответственно (Рис. 5Б). Исходя из полученных данных была рассчитана плотность бактериальных клеток на единицу объема агрегата –  $1,3 \times 10^5$  КОЕ/мм<sup>3</sup>,  $4,0 \times 10^6$  КОЕ/мм<sup>3</sup>,  $1,4 \times 10^7$  КОЕ/мм<sup>3</sup> для JM109, ATCC 43890 и M17, соответственно (рис. 5В).

Для исследования способности к формированию биопленок был использован стандартный метод окраски биопленок, выросших в 96-луночном круглодонном планшете, кристалвиолетом (O'Toole, 2011). Штаммы JM109 и M17 сформировали примерно одинаковые по толщине биопленки в течение 48 ч, в отличие от штамма ATCC 43890, который не способен формировать биопленки *in vitro*, что характерно для штаммов *E. coli* серотипа O157:H7 (рис. 5Г).

Способность бактерий к автоагрегации была дополнительно исследована с помощью стандартного метода, а именно седиментационного теста (Misawa et al., 2000). Полученные результаты сравнивали с результатами экспериментов с биопринтером. По итогам проведенных экспериментов значения оптической плотности для штаммов JM109 и M17 практически не отличались, а значения оптической плотности штамма ATCC 43890 отличались приблизительно на 10% от остальных штаммов (рис. 5Д).

Одним из ключевых факторов, определяющих как способность к формированию биопленок, так и способность к автоагрегации, является способность к формированию внеклеточного матрикса – сложной полимерной субстанции, состоящей преимущественно из экзополисахаридов, белков и внеклеточной ДНК. При исследовании *E. coli* и ряда других грамотрицательных бактерий на предмет продукции внеклеточного матрикса часто пользуются стандартным методом определения связывания красителя конго красного, связывающегося с курлями – амилоидоподобными белковыми структурами, находящимися на поверхности бактерий и входящими в структуру внеклеточного матрикса, в том числе, при выращивании *E. coli* на агаре (Garavaglia et al., 2012). Установлено, что штамм ATCC 43890 в этих условиях сформировал белые колонии, что означало отсутствие продукции курлей, что характерно для штаммов серотипа O157:H7, а штаммы M17 и JM109 сформировали красные колонии, что означало наличие курлей в составе колоний этих штаммов (Рис. 6А).

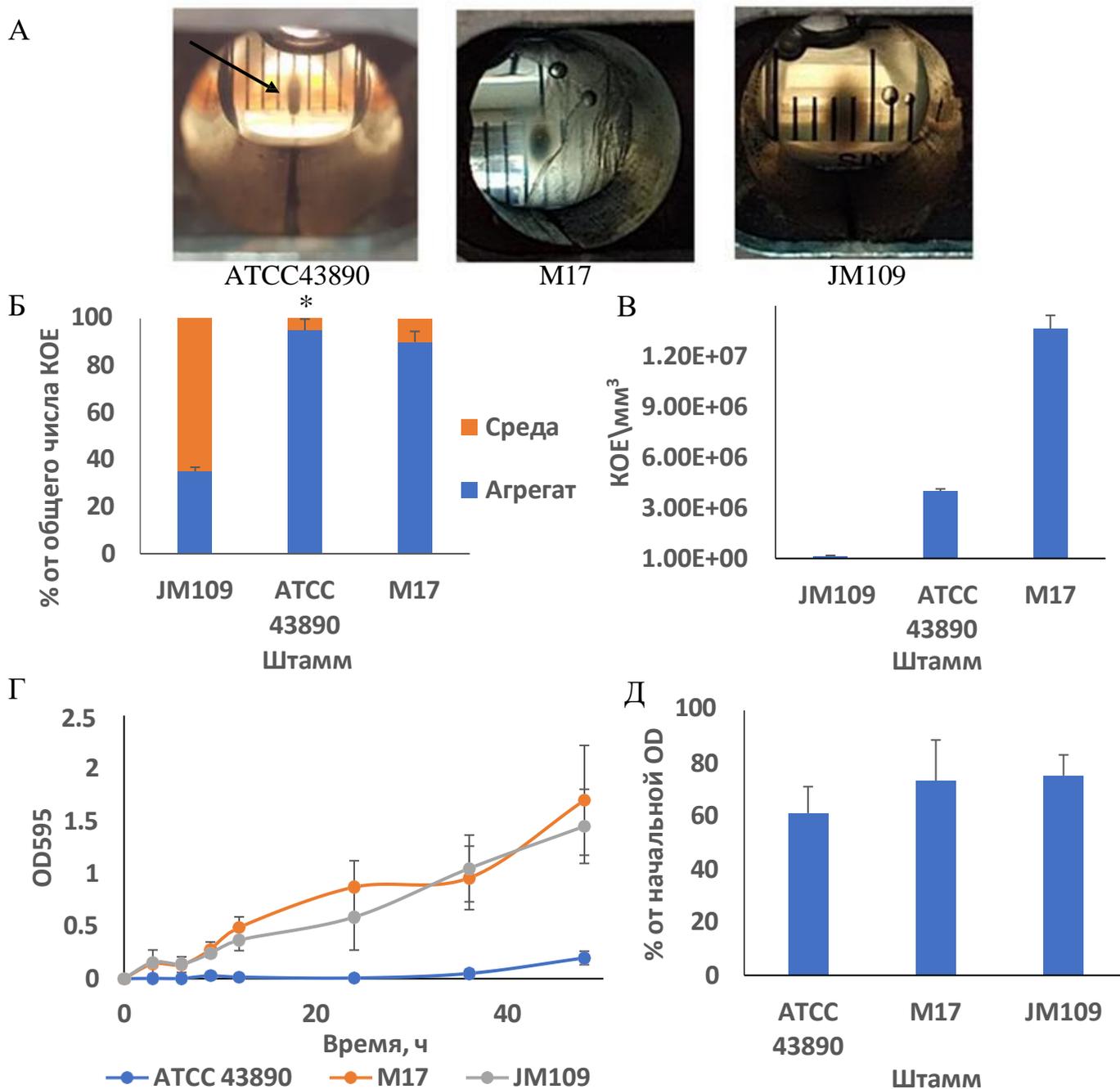


Рис. 5. Сравнительная характеристика эффективности автоагрегации и формирования биопленок штаммами *E. coli*. А – внешний вид агрегатов, Б – соотношение КОЕ агрегат/среда (\* –  $p < 0,05$ ), В – плотность КОЕ на 1 мм<sup>3</sup> агрегата, Г – динамика формирования биопленок, Д – оценка автоагрегации с помощью седиментационного теста

Наличие белков курлей в автоагрегатах было оценено с помощью модифицированного метода определения курлей с помощью конго красного: краситель добавили не в агар, а жидкую среду LB с гадобутролом, и выращивали в этой среде исследуемые штаммы в магнитном биопринтере. После инкубации бактерий в течение 144 ч связавшийся с агрегатом краситель был смыт 50% спиртом и по оптической плотности полученного раствора делался вывод о наличии матрикса в агрегатах и его количестве. Результаты в магнитном биопринтере оказались диаметрально противоположными тем, что были в эксперименте на агаре: штамм

АТСС 43890 связал приблизительно в 2 раза больше красителя, чем штамм JM109 (Рис. 6Б).

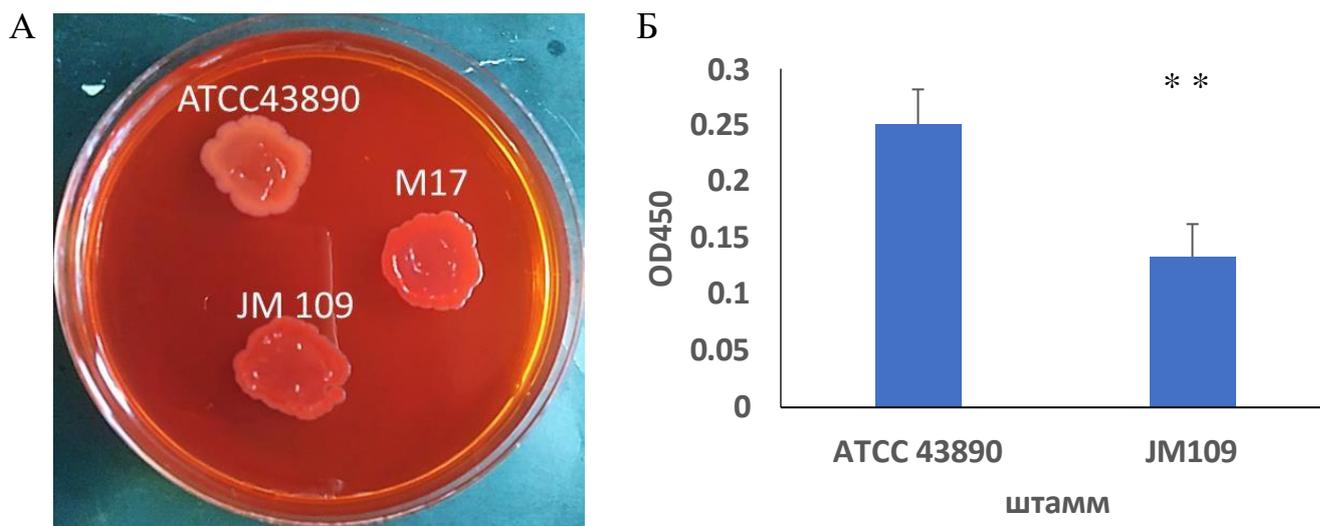


Рис. 6. Продукция курлей штаммами *E. coli*. А – оценка продукции курлей на агаре с конго красным, Б – связывание конго красного агрегатами в магнитном биопринтере (\*\* –  $p < 0,005$ )

На основании этих результатов была сформулирована гипотеза, что способность формировать биопленки и автоагрегаты не всегда коррелируют и что, возможно, механизмы формирования биопленок и автоагрегации различаются.

#### **Влияние генетических факторов на способность бактерий к автоагрегации**

Данная система может быть использована для анализа генетических детерминант бактериальной автоагрегации. Штамм АТСС 43890, способный к автоагрегации, но не формирующий биопленки, был выбран как модель для изучения генетических детерминант автоагрегации. На основе штамма АТСС 43890 был получен мутантный штамм, продуцирующий курли при выращивании на питательном агаре с красителем конго красным, благодаря спонтанной мутации. Полученный мутантный штамм получил название Срм (Curli producing mutant) (Рис. 7А).

Различий в формировании биопленок штаммами АТСС 43890 и Срм не было обнаружено. Таким образом, изменения, обусловленные мутацией, которые были получены в дальнейших экспериментах, относились только к автоагрегации независимо от способности к формированию биопленок.

Увеличенная продукция курлей сопровождалась существенным увеличением доли бактерий в агрегате относительно свободноплавающих бактерий. Если у штамма дикого типа количество бактерий в агрегате составляло около 90%, то у мутанта в агрегате находилось около 99% бактерий. Таким образом, полученные данные указывают, что увеличение продукции курлей увеличивает эффективность формирования автоагрегатов (рис. 7Б).

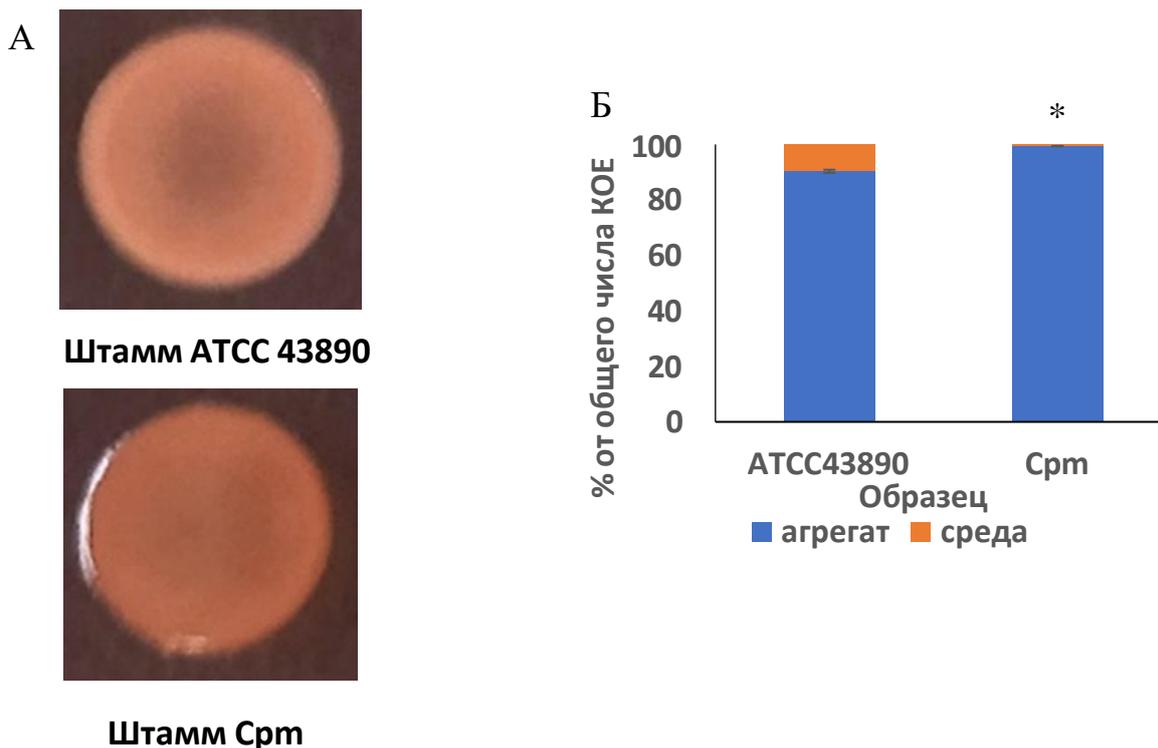


Рис. 7. Сравнение фенотипа дикого штамма *E. coli* ATCC 43890 и мутантного штамма Срт. А – связывание конго красного на агаре, Б – соотношение КОЕ в агрегате и в среде при росте в биопринтере (\* –  $p < 0,05$ )

### Картирование мутации в штамме Срт

Для картирования спонтанной мутации, приведшей к увеличению продукции курлей штаммов СРМ, были проанализированы гены, кодирующие регуляторы экспрессии гена *csgD*. Белок CsgD у *E. coli* является ключевым регулятором продукции внеклеточного матрикса, в том числе белков курлей, а также перехода от подвижного состояния к адгезированному. К белкам, положительно регулирующим экспрессию *csgD*, относятся MlrA, OmpR, IHF, RstA. Штаммы *E. coli* серотипа O157:H7 не продуцируют белок MlrA, т.к. нормальная структура гена *mlrA* нарушена встроенным в него профагом *stx1*. Однако в культуре этих штаммов как правило присутствуют в незначительном количестве клетки, утратившие профаг и восстановившие изначальную структуру гена *mlrA*. Поэтому утрата профага *stx1* рассматривалась как одна из возможных причин продукции курлей штаммом Срт. К белкам, отрицательно регулирующим экспрессию *csgD* относятся H-NS, CpxR, CRP, RscB. В структуре гена *rscB* находятся 2 пары прямых повторов, которые, согласно литературным данным, являются мутационными хот-спотами (Chen et al., 2015). По этой причине вероятность мутации, приводящей к продукции курлей штаммом *срт*, в данном гене выше, чем в остальных генах, кодирующих данную группу белков. Таким образом, были выбраны гены *mlrA* и *rscB*.

Штамм Срт сохранил профаг, нарушающий экспрессию *mlrA*. Далее был проведен поиск мутаций в последовательности гена *rscB*. По результатам проведенного анализа последовательностей, в штамме Срт была обнаружена точечная замена в гене *rscB* с цитозина на аденин в позиции 639, что привело к замене 206-й аминокислоты с серина на фенилаланин (рис. 8). Данная

аминокислотная замена произошла в участке взаимодействия белка RcsB с RcsA. Гетеродимер, получающийся при связывании RcsA и фосфорилированной формы RcsB, отрицательно регулирует экспрессию генов, играющих важную роль в адгезии бактерий к поверхности и друг к другу и формировании биопленок, а именно генов жгутикового белка флагеллина, Ag43 и курлей. Мутация в участке связывания могла привести к снижению аффинности белков RcsA и RcsB. По итогам проделанной работы была сформулирована гипотеза о том, что именно данная мутация являлась причиной изменений в фенотипе, наблюдаемых у штамма Сrm.



Рис. 8. Анализ сиквенсов гена *rcsB*. Сверху – последовательность ДНК, снизу – последовательность белка. Образцы: 82 – Сrm1, 2F – Сrm2, 3F – Сrm3, O157 1 – дикий штамм ATCC 43890, M17 1 – M17, *rcsB* – последовательность, взятая из базы данных GenBank

### Получение рекомбинантного штамма

Гиперэкспрессия гена *rcsA* может компенсировать пониженную вследствие мутации аффинность белков RcsA и RcsB. Для проверки этой гипотезы на основе штамма Сrm был получен мутант, гиперэкспрессирующий RcsA. Последовательность гена *rcsA* амплифицировали в ПЦР с праймерами RcsA1 и RcsA2 на матрице штамма *E. coli* ATCC 43890 (длина фрагмента – 895 п.н.). Продукт амплификации клонировали в вектор pAL2-T и трансформировали в штамм Сrm (рис. 9). Трансформированный мутантный штамм получил название Сrm(pAL2-T::*rcsA*). В качестве контроля в дальнейших исследованиях использовался мутантный штамм, в который трансформировали вектор pAL2-T без вставки. Данный штамм получил название Сrm(pAL2-T).

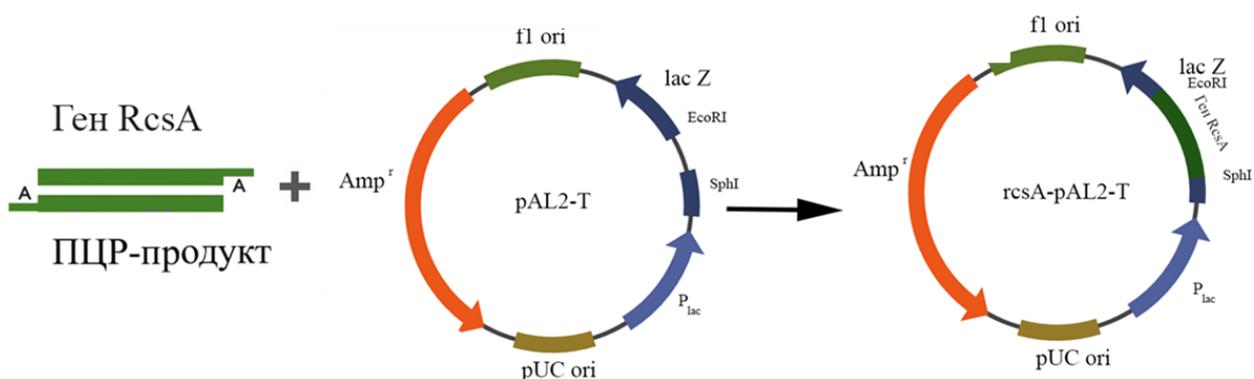


Рис. 9. Схема клонирования

### Исследование фенотипа полученного рекомбинантного штамма

Фенотип штаммов *Srm*(pAL2-T::*rcsA*) (далее в тексте *Srm*::p*RcsA*), *Srm*(pAL2-T) (далее в тексте *Srm*) и родительских штаммов исследовался в магнитном биопринтере методами посева на агар с конго красным, высевок с подсчетом КОЕ в агрегатах и в окружающей агрегаты среде и связывания агрегатами конго красного аналогично тому, что было сделано при исследовании дикого типа и штамма *Srm*. На агаре с конго красным штамм *Srm*::p*RcsA* не связал краситель (рис. 10А). Высевы образцов агрегатов и среды на агар показали, что число бактериальных КОЕ в агрегатах штамма *Srm*::p*RcsA* составило 87%, у контрольного штамма *Srm* – 97% от общего числа КОЕ (рис. 10Б).

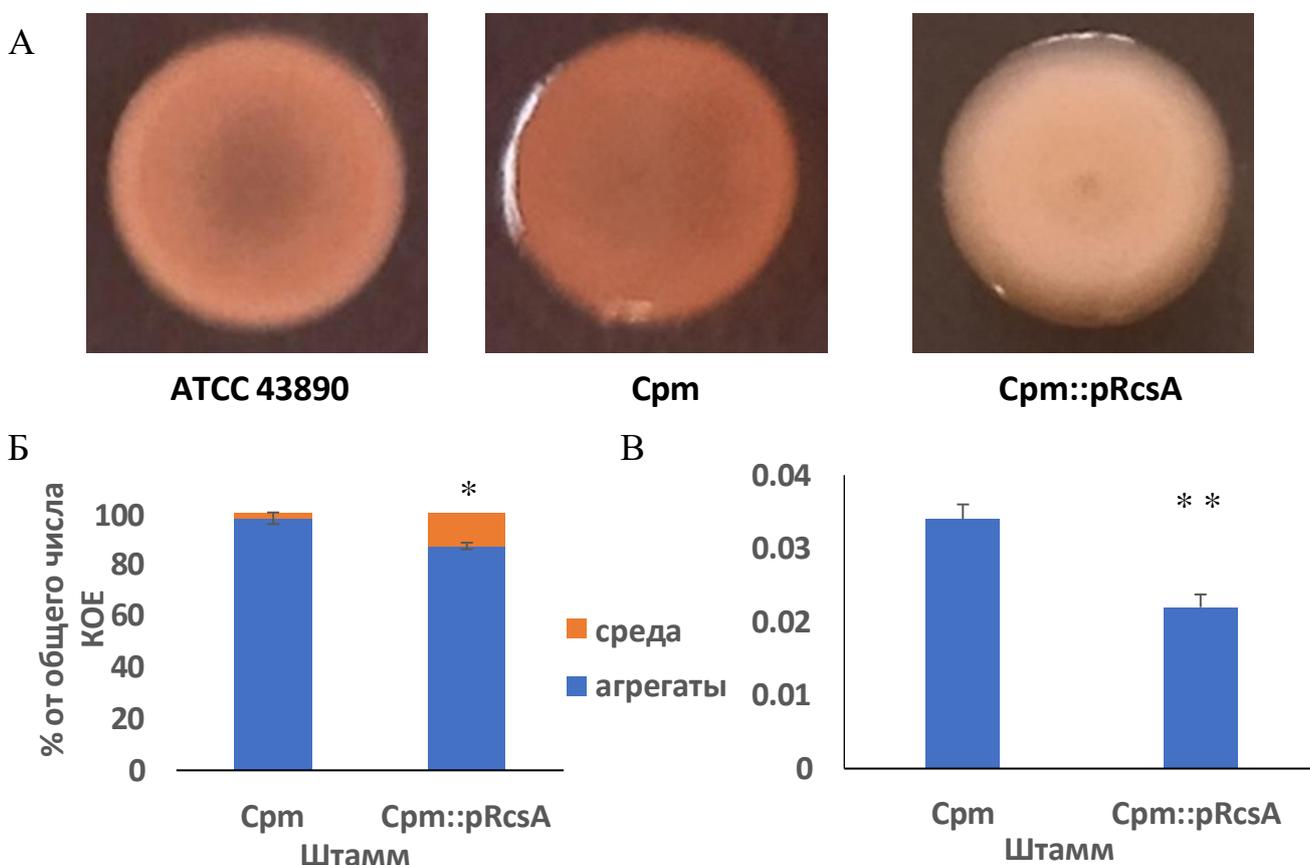


Рис. 10. Фенотип рекомбинантного штамма *Srm*::p*RcsA*. А – связывание конго красного на агаре, Б – соотношение КОЕ в агрегате и среде (\* –  $p < 0,05$ ), В – связывание конго красного в биопринтере (\*\* –  $p < 0,005$ )

Методом оценки связывания конго красного в магнитном биопринтере было показано, что штамм *Srm::pRcsA* связал на 35% больше красителя, чем контрольный штамм (0,022 и 0,034 оптические единицы соответственно) (рис. 10B).

### Сравнение спектра секретируемых белков штамма M17 в условиях магнитной левитации и стационарной культуры

Для лучшего понимания механизмов, влияющих на автоагрегацию *E. coli*, был проведен протеомный анализ бактериальной культуры в биопринтере. Протеомный анализ зафиксированных образцов, показал, что белки, у которых были обнаружены различия в степени экспрессии в условиях эксперимента, принадлежали к следующим функциональным классам: 1) белки, участвующие в метаболизме углеводов, 2) поверхностные белки. Из белков, участвующих в метаболизме углеводов, повысилась экспрессия изоцитратлиазы AceA в 2,46 раза и изоцитратдегидрогеназы Idh в 3,73, снизилась экспрессия ацетаткиназы AckA, анаэробной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и GlpA транскетолазы Tkt1 в 2,4 раза, а также метилглиоксальсинтазы MgsA в 2 раза. Среди поверхностных белков произошло повышение экспрессии белка-транспортера BtuB в 3,5 раза и белка-адгезина Ag43 в 2,5 раза и структурного белка жгутиков FliC 14 раз (таблица 1).

Таблица 1. Изменения протеома культуры *E. coli* M17 при росте в биопринтере (красным обозначено увеличение экспрессии, черным – снижение, незначительные изменения обозначены голубым)

Название белка	Соотношение экспрессии биоприинтер/контроль	Функциональный класс белков
AceA	2,46	Белки, участвующие в метаболизме углеводов
Idh	3,73	
TdcE	1,15	
PflB	1,07	
MgsA	0,5	
ElbB	1,07	
AckA	0,44	
GlpA	0,41	
Tkt1	0,41	
BtuB	3,48	Поверхностные белки
Ag43	2,46	

В августе-сентябре 2019 года был проведен эксперимент на базе МКС с целью исследовать сочетанное воздействие магнитного поля в биопринтере и невесомости на биологические объекты, в том числе на бактерии *E. coli* штамм M17. В условиях невесомости были выращены 2 группы образцов – в биопринтере и без биопринтера для оценки влияния космических условий на рост бактерий независимо от магнитного поля. Образцы выращивались и фиксировались на борту МКС, после чего возвращались на Землю, где уже проходило их исследование с помощью

протеомного анализа. Т.к., за исключением условий невесомости, условия экспериментов на МКС и предыдущего эксперимента на Земле были одинаковыми, то результаты этих экспериментов были объединены. Это дало возможность оценить различия в экспрессии белков на Земле и в космосе. Таким образом, было проведено сравнение протеомов в следующих группах образцов: 1) невесомость/контроль без биопринтера на Земле, 2) невесомость+биопринтер/контроль на Земле, 3) невесомость/биопринтер на Земле. Сравнение проводилось по тем же функциональным классам белков, что и в предыдущем эксперименте (таблица 2).

В условиях невесомости среди белков, участвующих в метаболизме углеводов, повысилась экспрессия изоцитратлиазы AceA в 4,29 раза и D-лактатдегидратазы ElpB в 2,46 раза и снизилась экспрессия изоцитратдегидрогеназы Idh на 53%, пируватформатлиаз TdcE на 71% и PflB на 67% и ацетаткиназы AckA на 43%. Среди поверхностных белков повысилась экспрессия белка-транспортера BtuB в 16 раз и белка-адгезина Ag43 в 2,64 раза.

При сочетанном воздействии невесомости и магнитного поля на бактерии среди поверхностных белков повысилась экспрессия белка-транспортера BtuB в 73,52 раза и белка-адгезина Ag43 в 2,46 раза.

Таблица 2. Сравнение протеомов культур *E. coli* M17 в различных экспериментальных условиях (красным обозначено увеличение экспрессии, черным – снижение, незначительные изменения обозначены голубым)

Название белка	Соотношения экспрессии			Функциональный класс белков
	Космос/ контроль на Земле	Космос+биопринтер/ контроль на Земле	Космос/ биопринтер на Земле	
AceA	4,29	9,85	2,3	Белки, участвующие в метаболизме углеводов
Idh	0,47	0,06	0,13	
TdcE	0,29	0,07	0,25	
PflB	0,33	0,18	0,33	
MgsA	1,62	5,66	3,48	
ElbB	2,46	-	2,46	
AckA	0,57	-	1,41	
GlpA	1,15	3,03	0,38	
Tkt1	1,07	3,03	2,64	
BtuB	16	73,52	4,29	
Ag43	2,64	2,46	1,07	

Наконец, при сравнении протеомов культур, выращенных в условиях невесомости и в биопринтере на Земле, были обнаружены следующие различия: среди белков, участвующих в метаболизме углеводов, повышена экспрессия AceA в 2,3 раза, MgsA в 3,48 раза, ElbB и Tkt1 в 2,64 раза, понижена экспрессия Idh на 87%, TdcE в 4 раза, PflB на 67% и GlpA на 62%, среди поверхностных белков повышена экспрессия BtuB в 4,29 раза. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования разработанной экспериментальной системы для моделирования поведения бактерий в невесомости.

## Заключение

В работе была апробирована новая модель для изучения бактериальной агрегации, основанная на феномене магнитной левитации. Инкубация бактерий, помещенных в питательной среде с добавлением 0,2 М гадобутрола для придания среде парамагнитных свойств в неравновесное магнитное поле, приводила к формированию бактериальных автоагрегатов, состоящих из бактериальных клеток и внеклеточного полимерного матрикса, окрашиваемых красителями, разработанными для биопленок и, видимо, сходных по составу с матриксом биопленок. В рамках сравнительного исследования штаммов *E. coli* были обнаружены различия в способности к автоагрегации между штаммами, не коррелирующие со способностью к формированию прикрепленных к субстрату биопленок, что указывает на различия в механизмах, обуславливающих данные процессы. Этот вывод был поддержан получением мутантного штамма со спонтанной мутацией в участке гена *rscB*, который более эффективно продуцировал поверхностные фимбрии курли при выращивании на агаре и в автоагрегатах и демонстрировал более эффективную автоагрегацию по сравнению с родительским штаммом, однако отличался от родительского штамма по формированию биопленок. С использованием разработанной модели впервые было показано, что автоагрегация энтерогеморрагической *E. coli* серотипа O157:H7 негативно контролируется гетеродимером RcsB/RcsA: точечная замена в гене *rscB* с цитозина на аденин в позиции 639 что приведшая к замене 206-й аминокислоты с серина на фенилаланин, нарушила связывание белка RcsB с белком RcsA, увеличив эффективность автоагрегации, а гиперэкспрессия RcsA, компенсирующая данную мутацию, приводила к уменьшению эффективности автоагрегации. С помощью разработанной экспериментальной системы были продемонстрированы схожие изменения в протеоме пробиотического штамма *E. coli* M17 при росте бактерий в условиях магнитной левитации и условиях невесомости в рамках эксперимента на борту МКС по сравнению с ростом в стандартной планктонной культуре. В целом, полученные результаты свидетельствуют, что разработанную модель можно использовать для изучения механизмов феномена автоагрегации бактерий, в том числе, вызванной условиями роста бактерий в космосе.

## Выводы

1. Подобраны оптимальные условия для получения и культивирования бактериальных автоагрегатов в новой экспериментальной системе, основанной на феномене магнитной левитации (магнитном биопринтере), разработаны количественные критерии эффективности автоагрегации, проведено сравнение со стандартными моделями автоагрегации.
2. На штаммах *E. coli* с разными способностями к формированию биопленок показано, что способность образовывать прикрепленные биопленки и способность автоагрегировать могут не коррелировать. Штаммы бактерий,

хорошо формирующие биопленки могут плохо автоагрегировать, а штаммы, не формирующие биопленки, могут эффективно автоагрегировать.

3. Показано, что регулятор транскрипции гетеродимер RcsB/RcsA отрицательно регулирует автоагрегацию патогенных *E. coli* серотипа O157:H7.
4. Показано, что при выращивании бактерий *E. coli* M17 в условиях магнитной левитации на Земле и в условиях микрогравитации в космосе сходным образом увеличивается экспрессия поверхностных белков Ag43 и VtuB и изменяется экспрессия ряда белков, участвующих в метаболизме углеводов, что свидетельствует о сходстве физиологических процессов автоагрегации бактерий в этих условиях и возможности использования разработанной экспериментальной системы для моделирования условий невесомости.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова:**

1. Domnin P., Arkhipova A., Petrov S., Sysolyatina E., Parfenov V., Karalkin P., Mukhachev A., Gusarov A., Moisenovich M., Khesuani Y., Ermolaeva S. An in vitro model of nonattached biofilm-like bacterial aggregates based on magnetic levitation //Applied and Environmental Microbiology. – 2020. – Vol. 86. – № 18. – e01074-20. DOI: doi.org/10.1128/AEM.01074-20 (WoS IF 4.792 Q 1; SJR IF 1.032 Q1) Вклад автора в печатных листах: (0,81/ 0,5).
2. Domnin P.A., Parfenov V.A., Kononikhin A.S., Petrov S.V., Shevlyagina N.V., Arkhipova A.Y., Koudan E.V., Nezhurina E.K., Brzhozovskiy A.G., Bugrova A.E., Moysenovich A.M., Levin A.A., Karalkin P.A., Pereira F.D.A.S., Zhukhovitsky V.G., Lobakova E.S., Mironov V.A., Nikolaev E.N., Khesuani Y.D., Ermolaeva S.A. Combined impact of magnetic force and spaceflight conditions on Escherichia coli physiology //International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – №. 3. – 1837. DOI: doi.org/10.3390/ijms23031837 (WoS IF 5.923 Q 1; SJR IF 1.15 Q1) (1,18 / 0,42)
3. Ermolaeva S.A., Parfenov V.A., Karalkin P.A., Khesuani Y.D., Domnin P.A. Experimentally created magnetic force in microbiological space and on-Earth studies: perspectives and restrictions //Cells. – 2023. – Vol. 12. – №. 2. – 338. DOI: doi.org/10.3390/cells12020338 (WoS IF 6.6 Q 1; SJR IF 1.54 Q1) (0,94 / 0,3)

**Прочие публикации:**

1. Домнин П.А., Захарченко А.Е., Реджепов Д.Т., Ермолаева С.А. Система для изучения механизмов флокуляции и автоагрегации бактерий, основанная на магнитной левитации //Тихоокеанский медицинский журнал. – 2023. – №. 1. – С. 38-43. (РИНЦ IF 0,563) (0,375/ 0,19)