

*На правах рукописи*

Терехов Станислав Сергеевич

Ультравысокопроизводительный скрининг клеточных библиотек с использованием технологии микрофлюидики для поиска биокаталитической и антимикробной активности

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

02.00.10 – биоорганическая химия

МОСКВА – 2016



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Современная биотехнология и фармацевтика являются крайне высокотехнологичными областями, чьи успехи тесно связаны с разработкой новых принципов поиска различных видов биологической активности. Микрофлюидные технологии открывают новые уникальные возможности для ультравысокопроизводительного скрининга. Уменьшение объема индивидуальной реакции в капле и одновременное увеличение производительности позволяет многократно сократить издержки и в то же время отобрать необходимое свойство из функциональных библиотек представительностью более  $10^7$  вариантов менее чем за сутки. Использование капель микрофлюидных двойных эмульсий (МДЭ) в качестве изолированных микроконтейнеров для проведения индивидуальных реакций, обусловленных инкапсулированными единичными живыми клетками, позволяет повысить чувствительность скрининга и производительность отбора благодаря монодисперсности МДЭ и использованию флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS). Разработка методов ультравысокопроизводительного скрининга активности, основанных на генерации МДЭ и отборе капель с использованием клеточного сортирования, представляет большой интерес, так как позволяет интегрировать микрофлюидные технологии в уже существующую и широкодоступную технологическую платформу FACS для анализа и отбора клеток.

Направленная эволюция рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека (рчБуХЭ) может быть использована для поиска новых вариантов мутантной рчБуХЭ, обладающих каталитическим гидролизом фосфорорганических токсинов (ФОТ). Однако практическое применение рчБуХЭ ограничено ввиду быстрого выведения мономерной и димерной рчБуХЭ, что требует разработки методов увеличения фармакокинетических характеристик фермента. Скрининг антибиотической активности также представляет большой интерес ввиду возникновения многочисленных штаммов патогенов, в частности *S. aureus*, обладающих устойчивостью к антибиотикам.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы являлось создание универсальной платформы для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антимикробной активности.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи:

- Произвести поиск мутантов рчБуХЭ, обладающих каталитическим гидролизом ФОТ.
- Улучшить фармакокинетические характеристики рчБуХЭ за счет ее экспрессии исключительно в форме тетрамера (4рчБуХЭ) и изучить профиль ее биораспределения и биодegradации.
- Провести поиск бактерий микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост *S. aureus*, и определить основные действующие вещества, обуславливающие эффекторные функции.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** В результате проделанной работы была создана платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антибактериальной активности в каплях МДЭ. В отличие от всех ранее опубликованных технологий ультравысокопроизводительного скрининга, разработанная платформа обладала максимальной простотой, доступностью и универсальностью, что позволяет использовать ее для функционального отбора из библиотек представительностью вплоть до  $10^9$  вариантов в течение суток. Разработанная платформа была создана с использованием биосовместимых компонентов и использована для высокоэффективного прижизненного отбора биокаталитической и антимикробной активности единичных клеток из популяций представительностью менее 0.001% и <0.005%, соответственно, за один раунд селекции. Высокая селективность и чувствительность платформы позволяли различать различные типы активности, а также различные уровни активности одного типа.

Практические возможности разработанной системы скрининга были успешно продемонстрированы для решения одной из наиболее актуальных задач современной токсикологии – создания мутантов рчБуХЭ, способных к каталитической инактивации ФОТ. Используя всего один раунд отбора из библиотеки мутантов ацил-связывающей петли, обладающей относительно небольшой представительностью  $\approx 3 \times 10^5$ , найдены новые мутанты рчБуХЭ, обладающие повышенной устойчивостью к инактивации ФОТ. Устойчивость отобранных мутантов к ингибированию ФОТ была обусловлена не только снижением реакционной способности к ФОТ, но и, что более важно, возникновением новой каталитической активности, связанной с гидролизом ФОТ. Таким образом, на основе рчБуХЭ *de novo* был создан биокатализатор (cl 14), обладающий одновременно высокоэффективным связыванием и каталитическим гидролизом РОХ, что демонстрирует ранее не описанные возможности создания каталитических антидотов ФОТ на основе БуХЭ, основанные на мутагенезе ее ацил-связывающей петли. Дальнейшее улучшение рчБуХЭ в качестве потенциального лекарственного препарата требовало значительного улучшения ее фармакокинетических характеристик. В отличие от всех предложенных ранее подходов, в данной работе основное внимание было уделено получению клон-продуцента исключительно тетрамерной (4рчБуХЭ) за счет имитации ее естественного механизма тетрамеризации *in vivo*. В результате были впервые получены экспрессионные вектора для продукции олигомерно чистой 4рчБуХЭ, обладающей периодом полувыведения, улучшенным более чем в 10 раз по сравнению с рчБуХЭ и в 2 раза по сравнению с конъюгатом рчБуХЭ с полисиаловыми кислотами (ПСА). Таким образом, использование подходов, основанных на *in vivo* тетрамеризации для улучшения фармакокинетических характеристик представляло более эффективную альтернативу, чем ее химическая модификация ПСА. Полученный препарат 4рчБуХЭ обладал низким накоплением в тканях, основным компартментом ответственным за его биodeградацию являлась

печень, а низкомолекулярные продукты биодegradации выводились почками с мочой.

Универсальность разработанной платформы позволила использовать ее не только для скрининга биокаталитической, но и антибактериальной активности. Используя модельную систему, основанную на кокультурации “бактерий-убийц” *Streptomyces venezuelae*, продуцирующих антибиотик, патогенных “бактерий-жертв” *Staphylococcus aureus* и нейтральных “бактерий-сожителей” *Escherichia coli* удалось осуществить скрининг индивидуальных попарных взаимодействий в каплях. Использование подходов, основанных на кокультурации в каплях, позволили выявить представителей микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост *S. aureus*. Широкомасштабное секвенирование позволило без культивации предсказать бактерии-ингибиторы *S. oralis* и *P. aeruginosa*, которые были впоследствии отобраны с использованием капель и демонстрировали продукцию метаболитов, ингибирующих рост *S. aureus in vitro*. Методами 16S и полногеномного секвенирования удалось предсказать высокоэффективное обогащение медленно растущих *Propionibacterium acnes*, которых было невозможно идентифицировать классическими методами культивации ввиду их чрезвычайно низкой скорости деления. Это позволяет сделать вывод о том, что разработанная платформа может быть использована для предсказания ингибирующих свойств медленно растущих и “некультивируемых” представителей микробиоты. Метаболомный анализ показал, что *P. aeruginosa* высокоэффективно ингибируют рост *S. aureus in vitro* за счет продукции вторичных метаболитов, обладающих синергическим действием, направленным на индукцию окислительного стресса.

Таким образом, на примере отобранных мутантов БуХЭ и метаболитов *P. aeruginosa* удалось показать, что разработанная платформа позволяет осуществлять как высокоэффективный отбор искомого фенотипа, так и определять, чем обусловлены его эффекторные свойства.

**Публикации и апробация работы.** По теме работы опубликовано 4 статьи в журналах, входящих в список ВАК. Результаты работы были представлены на 7 конференциях: V съезд биохимиков России (2016, Дагомыс, Россия), 41-ый конгресс FEBS (2016, Kusadasi, Turkey), XXVIII зимняя молодежная научная школа (2016, Москва, Россия), конференция 12th ChE-6PON (2015, Elche, Spain), 40-ой конгресс FEBS (2015, Berlin, Germany), XXVII зимняя молодежная научная школа (2015, Москва, Россия), XXVI зимняя молодежная научная школа (2014, Москва, Россия).

**Структура и объем диссертационной работы.** Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы и приложение. Материал иллюстрирован 57 рисунками и 4 таблицами. Библиографический указатель включает в себя 237 цитированных работ.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Создание микрофлюидной платформы для ультравысокопроизводительного скрининга в каплях МДЭ

В основе универсальной платформы для ультравысокопроизводительного скрининга был использован принцип *in vitro* компартиментализации в каплях МДЭ (Рис. 1А).

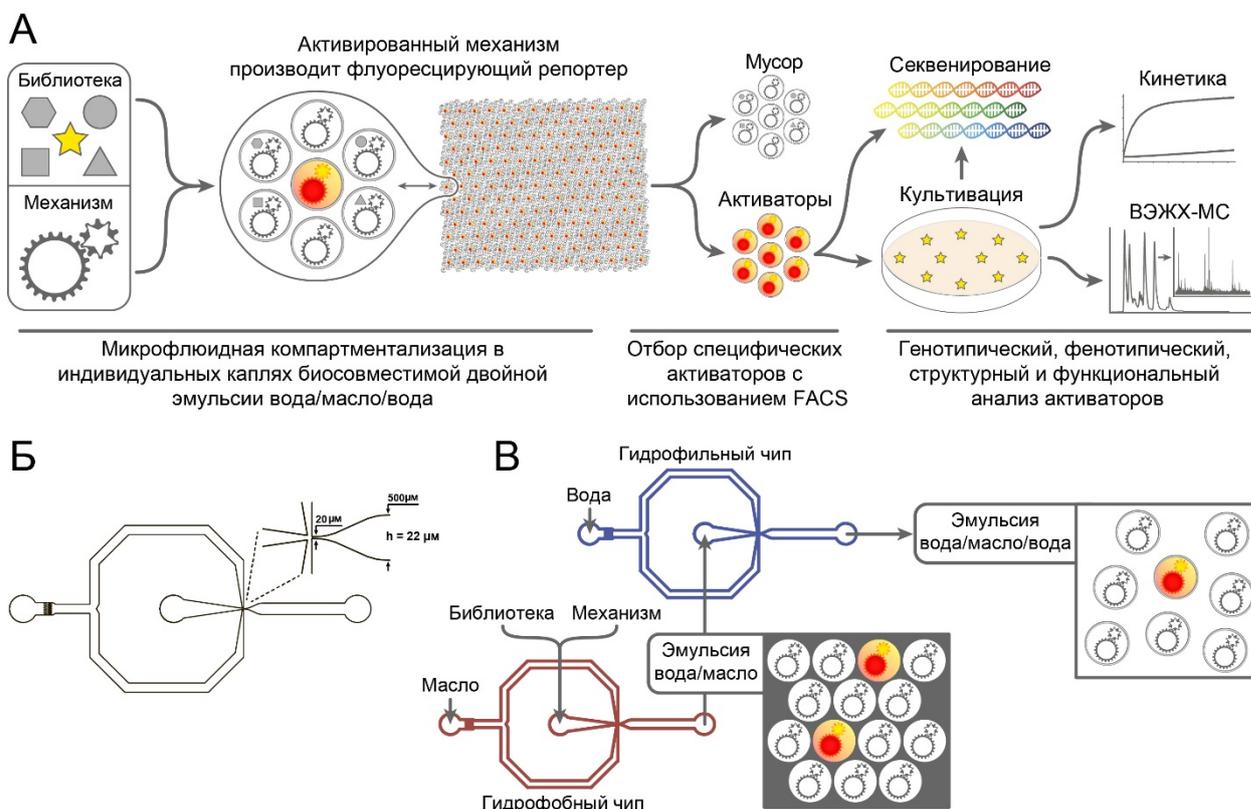


Рис. 1. (А) Микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга в каплях МДЭ. (Б) Текстура каналов микрофлюидного чипа. (В) Генерация МДЭ методом последовательной эмульсификации в микрофлюидных чипах.

Для проведения скрининга в каплях необходимо подобрать некий высоко специфический механизм, активируемый искомым фенотипом. Активированный “механизм” должен приводить к изменению флуоресценции, используемой в качестве аналитического сигнала. Микрофлюидная компартиментализация библиотеки фенотипов вместе с “механизмом” в каплях биосовместимой МДЭ вода/масло/вода приводит множеству индивидуальных микрокомпарментов, в которых может происходить активация механизма, приводящая к изменению флуоресценции. После этого фенотипы-активаторы подвергаются отбору с использованием флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS) и могут быть проанализированы напрямую без культивации методом широкомасштабного секвенирования, что принципиально важно в случае некультивируемых и медленно растущих микроорганизмов, или подвергнуты культивации. Впоследствии культивируемые фенотипы-активаторы подвергаются генотипическому, фенотипическому, структурному и функциональному анализу.

Генерация МДЭ проводилась методом последовательной эмульсификации в микрофлюидных чипах (Рис. 1Б,В). Контроллер давления осуществлял подачу сжатого воздуха в 4 резервуара с жидкостями: водной фазой, несущей библиотеку фенотипов; водной фазой, несущей механизм; масляной фазой и внешней водной фазой. Давление сжатого воздуха вызывало течение жидкостей в чипах. Скорость течения жидкостей определялась контроллерами потока, соединенными петлей обратной связи с контроллером давления. Непосредственно перед входом в чип потоки водных фаз, несущих библиотеку фенотипов и механизм, соединялись и попадали в гидрофобный чип. В гидрофобном чипе поток объединенной внутренней водной фазы разбивался на отдельные капли в потоке масляной фазы, и полученная в результате однократная эмульсия вода/масло попадала в гидрофильный чип. В гидрофильном чипе поток эмульсии вода/масло разбивался на отдельные капли двойной эмульсии вода/масло/вода в потоке внешней водной фазы. Для микрофлюидной компартментализации были использованы микрофлюидные чипы из полидиметилсилоксана, полученные с использованием технологии мягкой литографии. Разбиение потока дисперсной фазы происходило в самом узком месте чипа, где встречались потоки несмешивающихся жидкостей. Использованные чипы имели размер каналов 20 мкм и 60 мкм, что позволяло генерировать МДЭ диаметром 20-90 мкм. Уменьшение размеров каналов чипа приводило к увеличению производительности. Генерация МДЭ происходила с производительностью  $\approx 25000$  событий в секунду в чипе с размером каналов 20 мкм и  $\approx 3000$  событий в секунду в 60 мкм чипе.

### **Эффективность отбора биокатализаторов из смеси активных и неактивных клеток**

Для оценки эффективности скрининга биокатализаторов были использованы искусственные смеси активных (продуцирующих заякоренный фермент и красный флуоресцентный белок-репортер mCherry) и неактивных (продуцирующих Fab-фрагмент антитела и не имеющих флуоресцентного репортера) дрожжевых клеток (Рис. 2А). Компартментализация смеси активных и неактивных клеток вместе с флуорогенным субстратом в каплях МДЭ приводила к образованию двух популяций с различным уровнем флуоресценции продукта. Отбор капель, обладавших наибольшим уровнем флуоресценции, с использованием FACS приводил к обогащению активными клетками. МДЭ обладала высокой монодисперсностью (Рис. 2Б), а накопление продукта реакции происходило исключительно в каплях, несущих активные дрожжевые клетки. Степень обогащения активных клеток в результате отбора из смеси активных с неактивными была близка к теоретическому пределу в случае разведений 1:10 и 1:100. Даже для разведения 1:10<sup>5</sup> наблюдалось более 35% активных клонов после одного раунда отбора, что всего в 2 раза меньше, чем теоретический максимум. Таким образом, для клеток, обладающих биокаталитической активностью, была показана чрезвычайно высокая эффективность отбора из смеси активных и неактивных клеток с использованием лишь одного раунда скрининга.

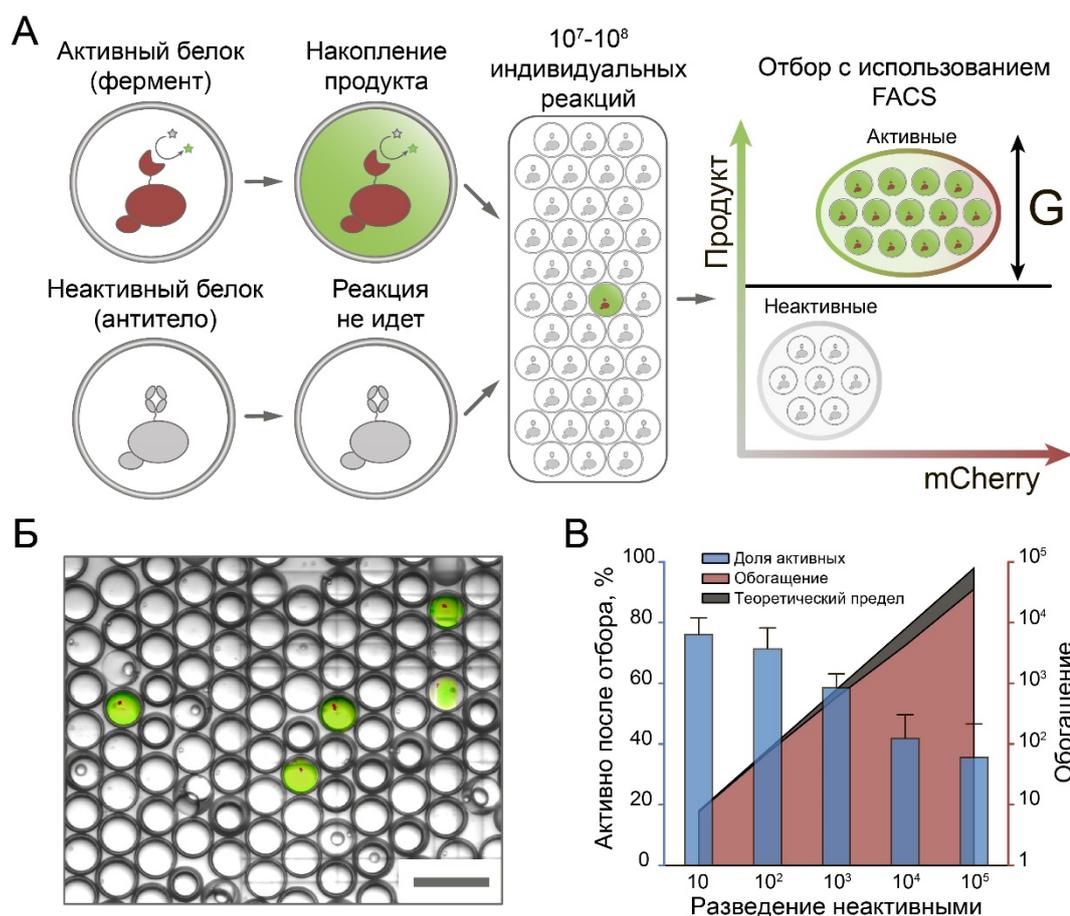


Рис. 2. (А) Схема ультравысокопроизводительного скрининга биокатализаторов в каплях МДЭ. (Б) Микроскопия смеси 1:10 активных и неактивных клеток (шкала – 100 мкм). (В) Эффективности скрининга смесей активных и неактивных клеток после 1 раунда отбора.

### Селективность отбора биокатализаторов из смеси биокатализаторов с разной специфичностью или различным уровнем активности

Для демонстрации универсальности платформы были использованы три различных фермента, демонстрирующие фосфодиэстеразную (дезоксирибонуклеаза I – ДНКаза), протеазную (энтеропептидаза – ЭК) и эстеразную (бутирилхолинэстераза – БуХЭ) активность, а также разные флуорогенные субстраты, действовавшие по принципу FRET-пары, нефлуоресцентного амида, и сопряженной реакции (Рис. 3А). Для проведения скрининга биокатализаторов из смеси с различной субстратной специфичностью была использована “искусственная библиотека активностей”, представлявшая собой смесь активных дрожжей, несущих по отдельности каждый из трех биокатализаторов, и 100 кратного избытка неактивных клеток. Таким образом, доля клеток каждого типа активности составляла менее 1% в смеси. Каждый из типов биокаталитической активности был селективно отобран на заданную ферментативную активность с эффективностью, близкой к теоретическому максимуму, без обогащения клетками, несущими другой тип активности (Рис. 3Б).

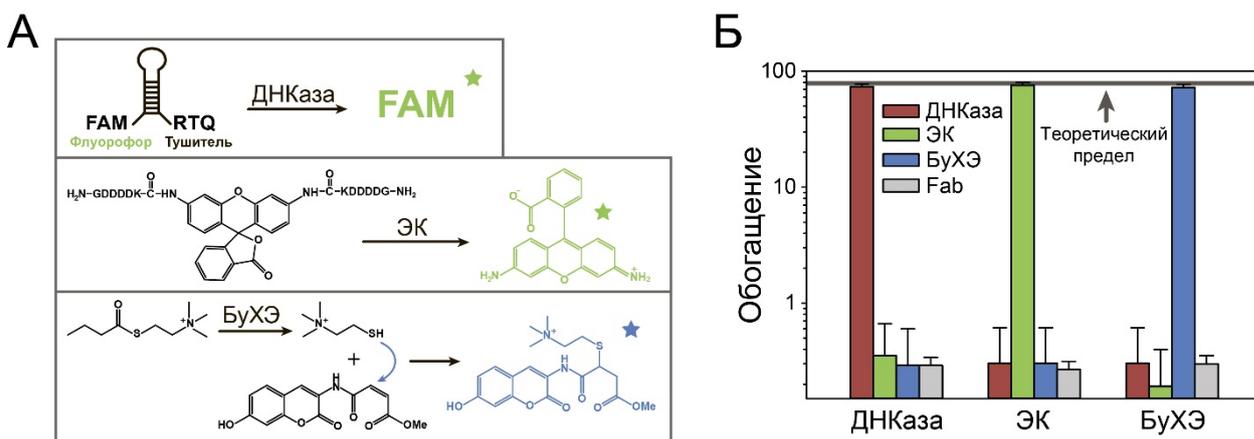


Рис. 3. (А) Схемы ферментативных реакций в каплях. (Б) Специфический отбор каждого из биокатализаторов из смеси ферментов.

Для того чтобы изучить, как эффективность и селективность отбора зависит от активности биокатализатора, была использована библиотека БуХЭ. Библиотека имела представительность порядка  $3 \times 10^5$  вариантов и содержала 5 подряд идущих аминокислотных замен в последовательности БуХЭ дикого типа (WT) 284-TPLSV-288 ацил-связывающей петли, расположенной недалеко от активного центра фермента (Рис. 4А). Дрожжи, несущие заякоренные мутанты БуХЭ, были инкапсулированы вместе с флуорогенным субстратом в каплях МДЭ. Полученные в результате капли обладали различным уровнем флуоресценции и были отобраны с использованием трех гейтов G1-G3 с различным уровнем флуоресценции  $G1 > G2 > G3$  (Рис. 4Б). Анализ активности индивидуальных клонов, полученных до и после отбора, свидетельствует об эффективности отбора в случае использования каждого из трех гейтов. Клоны, отобранные из капель с наибольшим уровнем флуоресценции, обладали наибольшим уровнем активности. Таким образом, было качественно показано, что разработанная платформа может быть использована для отбора биокатализаторов с различным уровнем активности одного типа. Для того, чтобы количественно оценить эффективность отбора биокатализаторов с различным уровнем активности одного типа, были использованы три клона мутантной БуХЭ с различным уровнем ферментативной активности (Рис. 4В). Компартиментализация клеток клонов cl 3, cl 8, cl 13 и контрольных клеток вместе с субстратом в каплях приводила к образованию четырех популяций с различным уровнем флуоресценции, соответствовавших различным уровням накопления продукта: cl 3 – много, cl 8 – средне, cl 13 – мало (Рис. 4В). Клоны cl 3, cl 8 и cl 13, а также контрольные клетки (Fab) были смешаны друг с другом в равном соотношении и в соотношении 1:1:1:1000. После чего они были отобраны с использованием гейтов, соответствующих высокой (“Много”), средней (“Средне”) и низкой (“Мало”) флуоресценции продукта. Для соотношения 1:1:1:1 мы наблюдали специфическое обогащение каждого из мутантов БуХЭ с эффективностью, близкой к теоретическому максимуму.

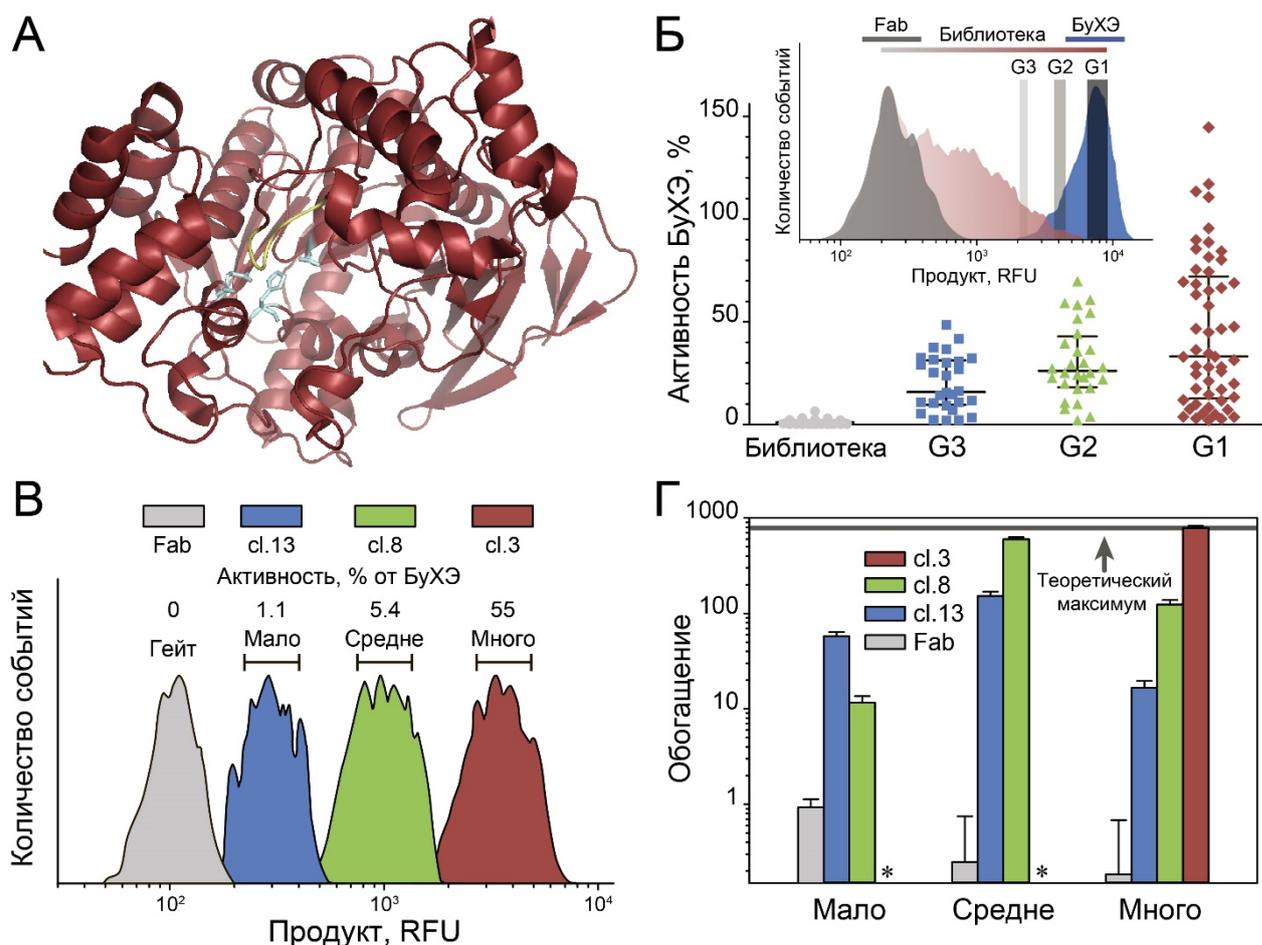


Рис. 4. (А) Структура БуХЭ: каталитическая триада S198-N438-E325 обозначена серым цветом, мутированная последовательность 284-TPLSV-288 – желтым. (Б) Активность индивидуальных клонов библиотеки до и после отбора с использованием гейтов G1-G3. Врезка демонстрирует распределение каплей, несущих контрольные клетки (серый), библиотеку (красный), а также БуХЭ дикого типа (синий) по флуоресценции, а также уровень флуоресценции гейтов G1-G3. (В) Мутанты БуХЭ с различным уровнем активности приводят к образованию каплей с различным уровнем флуоресценции. (Г) Обогащение мутантов с различным уровнем активности из смеси 1:1:1:1000.

В случае соотношения 1:1:1:1000, обогащение клонов cl 3 и cl 8 происходило с эффективностью, близкой к максимальной, в то время как эффективность обогащения клона cl 13 была приблизительно на порядок ниже (Рис. 4Г). Таким образом, для отбора клеток, обладающих активностью в 2 раза выше, чем у контрольных клеток, за 1 раунд скрининга, их концентрация должна быть не менее 0.1%. Для клеток, обладающих более чем в 5 раз большей активностью по сравнению с контролем, эффективный отбор за 1 раунд скрининга возможен даже в том случае, если их популяция составляет менее 0.1%. В случае высокоактивных ферментов ДНКазы, ЭК и БуХЭ дикого типа, доля активных клеток может составлять менее 0.001%. Следует также отметить, что отбор каплей, обладающих средней и низкой флуоресценцией, приводит к высокоэффективному исключению высокоактивного клона cl 3, что может быть использовано для идентификации мутаций, приводящих к потере активности.

## Отбор мутантов БуХЭ, устойчивых к действию ФОТ

Для отбора мутантов БуХЭ, устойчивых к действию ФОТ, была использована описанная выше библиотека БуХЭ. Дрожжевые клетки, несущие мутанты БуХЭ, инкубировались с параоксоном (РОХ) или кумариновым аналогом зомана (GD<sub>C</sub>), после чего отмывались от избытка ФОТ и подвергались скринингу на наличие остаточной активности БуХЭ. Взаимодействие БуХЭ дикого типа и ФОТ приводит к быстрой (с высокой бимолекулярной константой скорости  $k_1/K_i$ ) и необратимой ( $k_2 \approx 0$ ) инактивации БуХЭ за счет фосфилирования остатка S198 в активном центре (Рис. 5А).

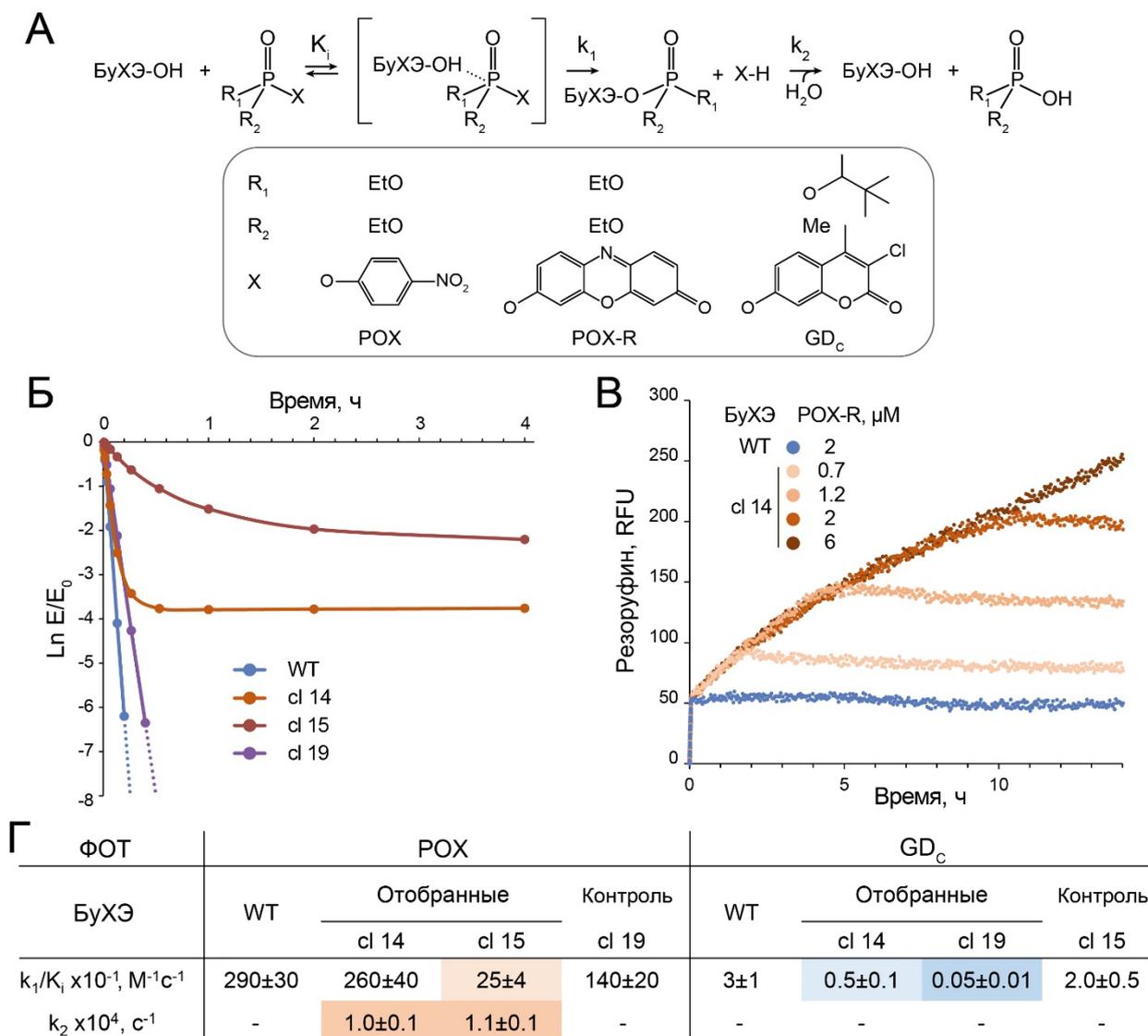


Рис. 5. (А) Схема взаимодействия БуХЭ и ФОТ. (Б) Кинетика ингибирования параоксоном БуХЭ дикого типа (WT), мутанта cl 19, отобранного на GD<sub>C</sub>, и мутантов cl 14 и cl 15, отобранных на устойчивость к РОХ. (В) Мутант cl 14, в отличие от WT, демонстрировал каталитический гидролиз РОХ-Р. Концентрации ферментов 0.45 мкМ. (Г) Кинетические константы БуХЭ дикого типа (WT) и мутантов, отобранных на устойчивость к РОХ и GD<sub>C</sub>.

В отличие от БуХЭ дикого типа (WT), cl 14 и cl 15, отобранные на устойчивость к РОХ, демонстрировали наличие остаточной активности даже в случае продолжительного ингибирования РОХ (Рис. 5Б). Более того, в отличие от

WT, c1 14 и c1 15 демонстрировали каталитический гидролиз ФОТ, который был идентифицирован с использованием флуоресцентного аналога РОХ-R (Рис. 5В). После быстрой стадии ковалентной модификации c1 14 и WT, приводящей к выделению стехиометрического количества резорфина, WT остается полностью модифицированным, в то время как c1 14 продолжает медленно реагировать с новыми молекулами РОХ-R, что в итоге приводит к полному гидролизу РОХ-R. Таким образом, мутанты c1 14 и c1 15 приобрели новую параоксоназную каталитическую активность за счет возникновения самореактивации ( $k_2 > 0$ ). В отличие от c1 14, обладавшего высокой реакционной способностью по отношению к РОХ, сопоставимой с WT, мутант c1 15, также демонстрировавший каталитический гидролиз РОХ-R, обладал значительно более низкой скоростью взаимодействия с РОХ (Рис. 5Г). Мутанты, отобранные на устойчивость к GD<sub>C</sub>, не обладали каталитическим гидролизом GD<sub>C</sub>, что, по-видимому, было связано с чрезвычайно быстрым старением аддуктов зомана. В свою очередь возникновение повышенной устойчивости мутанта c1 19 к взаимодействию с GD<sub>C</sub>, было связано с более чем 60-ти кратным снижением реакционной способности по отношению к GD<sub>C</sub>.

Таким образом, в результате скрининга относительно небольшого разнообразия мутантов БуХЭ, за один раунд отбора из библиотеки представительностью порядка  $3 \times 10^5$ , были отобраны варианты фермента, демонстрировавшие значительно более высокую устойчивость по отношению к ингибированию ФОТ. Причем в случае РОХ были *de novo* созданы мутанты БуХЭ, обладающие новой каталитической активностью. В результате были получены новые каталитические антитоды на основе стехиометрического антитода БуХЭ. В отличие от классических методов рационального дизайна, направленного мутагенеза и кантово-механических расчётов, использование микрофлюидной платформы скрининга, впервые более чем за 20 лет поиска, позволило одновременно обнаружить несколько аминокислотных позиций БуХЭ, приводящих к возникновению каталитического гидролиза ФОТ.

#### **Улучшение фармакокинетических характеристик рчБуХЭ за счет ее продукции исключительно в виде тетрамера**

Проблема быстрого выведения рчБуХЭ представляет высокую важность, так как основные источники рчБуХЭ – растения и молоко трансгенных животных приводят к продукции мономерной и димерной БуХЭ, имеющей чрезвычайно быстрый период полувыведения ( $\tau_{1/2} \approx 2$  мин). Для решения этой проблемы был использован подход, основанный на *in vivo* тетрамеризации рчБуХЭ (Рис. 6). В отличие от предыдущих работ, в которых увеличение доли тетрамерной рчБуХЭ (4рчБуХЭ) достигалось за счет котрансфекции генетической конструкцией, необходимой для продукции пролин-богатого пептида тетрамеризации PRAD (поколение GI), в данной работе были созданы вектора нового поколения GII, обеспечивающие продукцию исключительно 4рчБуХЭ.

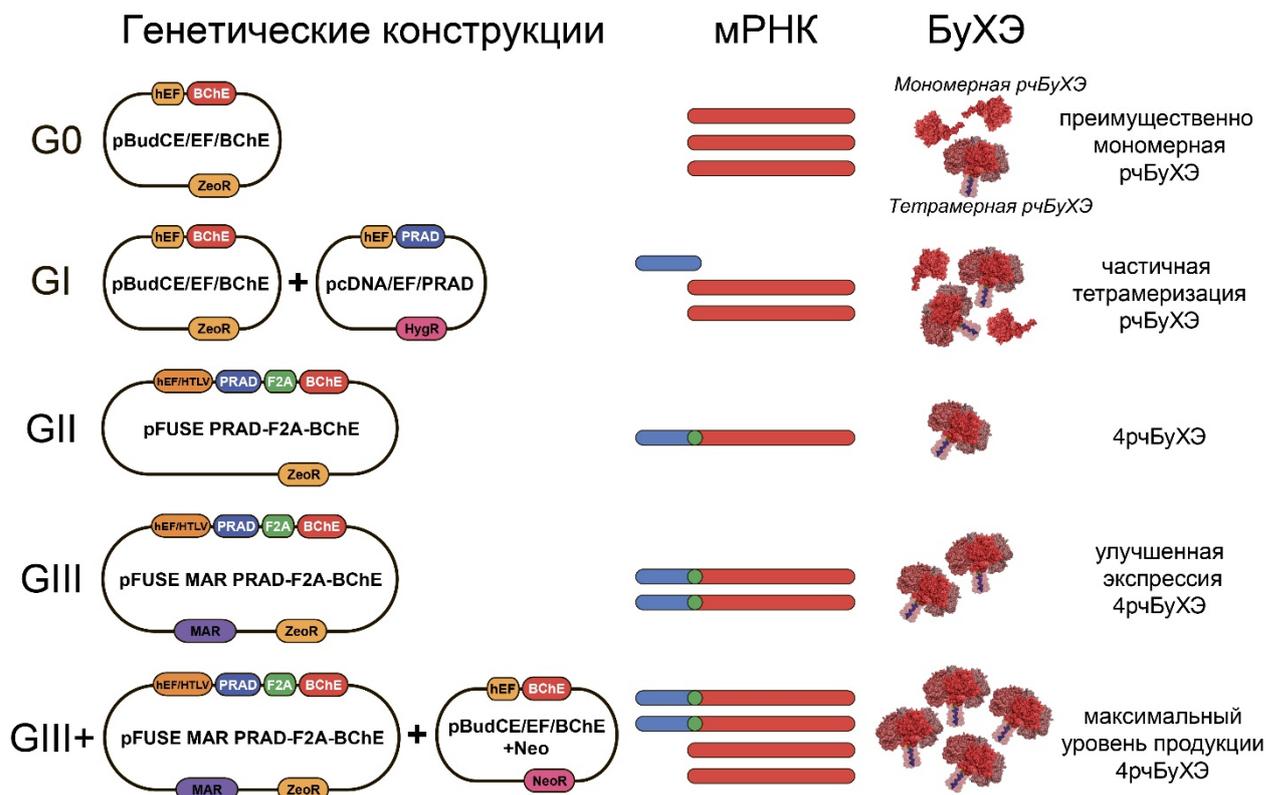


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая основные принципы, заложенные в основу создания генетических конструкций нового поколения (GII, GIII и GIII+), обеспечивающих продукцию рчБуХЭ исключительно в естественной тетрамерной форме.

Полной тетрамеризации БуХЭ удалось добиться за счет экспрессии под одним промотором гена пролин-богатого пептида тетрамеризации PRAD, участвующего в естественном процессе тетрамеризации фермента, и гена БуХЭ. Последовательности PRAD-пептида и БуХЭ были разделены последовательностью “самопроцессирующегося” F2A пептида, приводящего к трансляции избытка PRAD-пептида по отношению к БуХЭ. Для увеличения уровня экспрессии в генетические конструкции были введены последовательности связывания с ядерным матриксом (MAR). Так как комплекс 4рчБуХЭ состоит из 4 субъединиц рчБуХЭ и 1 PRAD-пептида. Очевидно, что при использовании векторов поколений GII и GIII PRAD-пептид продуцируется в избытке по отношению к рчБуХЭ. Этот факт был использован для создания поколения GIII+ суперпродуцентов 4рчБуХЭ за счет введения дополнительных копий гена БуХЭ (Рис. 6).

Препарат 4рчБуХЭ демонстрировал фармакокинетические характеристики ( $\tau_{1/2} = 32.4 \pm 1.2$  ч), улучшенные на три порядка по сравнению с препаратами мономерной и димерной рчБуХЭ ( $\tau_{1/2} \approx 2$  мин), а также более чем в 10 раз по сравнению с рчБуХЭ в виде смеси олигомеров (поколение G1) и 2 раза по сравнению с конъюгатом рчБуХЭ-ПСА. Это позволяет использовать 4рчБуХЭ для терапии отравлений ФОТ (Рис. 7А). Для изучения профиля биораспределения 4рчБуХЭ был получен препарат, меченый радиоизотопом  $^{125}\text{I}$ . Препарат 4рчБуХЭ демонстрировал низкое накопление в мозге, жировой, а также мышечной ткани (Рис. 7Б).

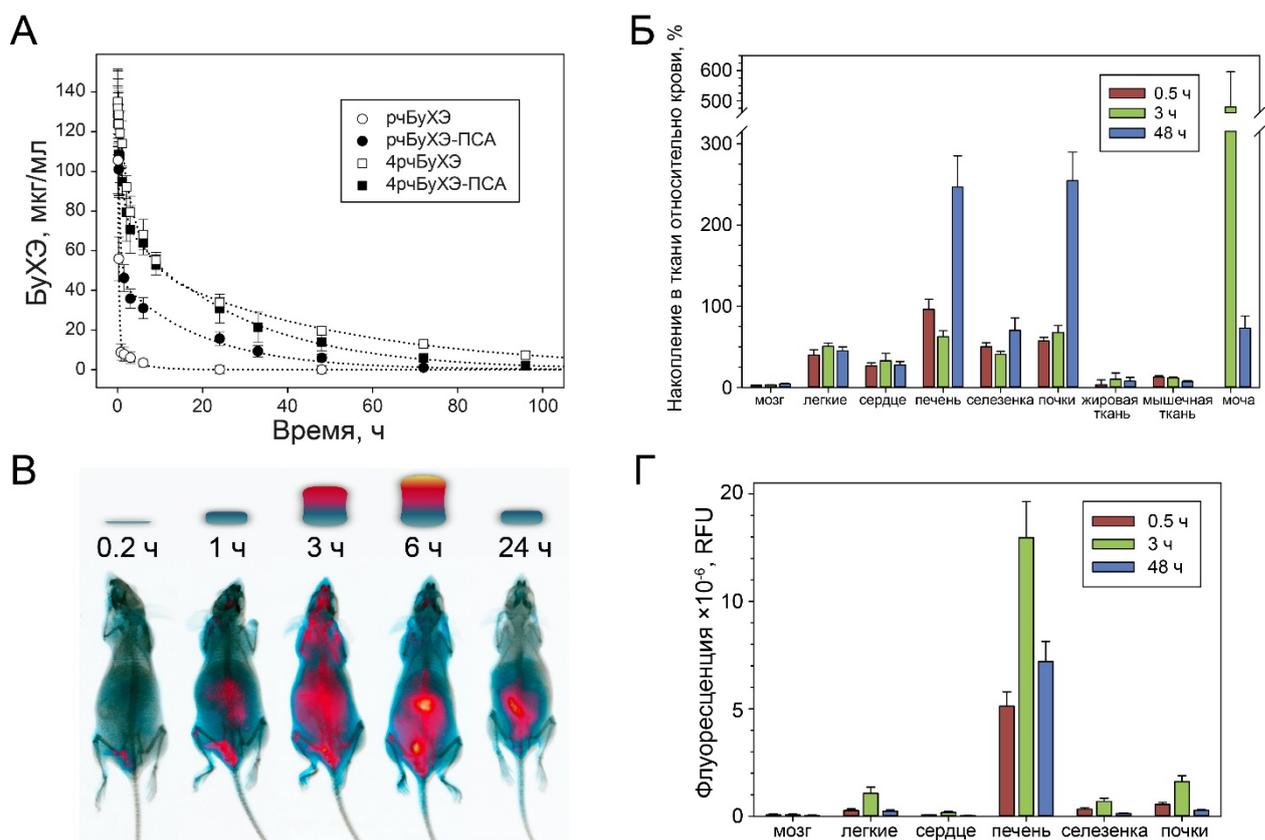


Рис. 7. (А) Фармакокинетика выведения препаратов рчБуХЭ после внутривенного введения. (Б) Накопление препарата 4рчБуХЭ в органах и тканях. (В) Визуализация профиля прижизненной биодegradации препарата 4рчБуХЭ-sCy7. (Г) Флуоресценция органов мыши после внутривенного введения конъюгата 4рчБуХЭ-sCy7.

В первые часы после введения 4рчБуХЭ незначительно накапливалась в печени. Спустя 48 часов 4рчБуХЭ накапливалась в печени и почках. Высокий уровень радиоактивности мочи свидетельствовал о том, что низкомолекулярные продукты биодegradации 4рчБуХЭ выводились почками. Для изучения профиля биодegradации 4рчБуХЭ были получены его конъюгаты с инфракрасным флуоресцентным красителем sCy7. Избыточное мечение 4рчБуХЭ приводило к самотушению sCy7, таким образом, протеолиз препаратов 4рчБуХЭ-sCy7 приводил к многократному увеличению флуоресценции, что было использовано для прижизненной визуализации биодegradации *in vivo* (Рис. 7В). Основным компартментом, ответственным за биодegradацию 4рчБуХЭ, была печень, а низкомолекулярные продукты биодegradации выводились почками (Рис. 7Г).

Для демонстрации протективного действия 4рчБуХЭ была использована мышьяная модель отравления ФОТ параоксоном (РОХ). Для оценки влияния эндогенной БуХЭ мыши на тяжесть отравления РОХ, были использованы мыши дикого типа (WT), а также мыши, нокаутные по гену БуХЭ (КО). Нокаутные мыши демонстрировали большую чувствительность по отношению к РОХ, выраженную в более низком значении LD<sub>50</sub> 500±10 мкг/кг (Рис. 8А), а также более тяжелых симптомах отравления (Рис. 8Б). Внутривенное введение 4рчБуХЭ в дозе 50 мг/кг приводило к увеличению LD<sub>50</sub> как у мышей дикого типа (с 520±15 до 660±20 мкг/кг),

так и у нокаутных мышей (с  $500 \pm 10$  до  $580 \pm 20$  мкг/кг), а также значительному снижению тяжести симптомов отравления мышью WT и КО. Более того, внутривенное введение 4рчБуХЭ в дозе 50 мг/кг, обеспечивало 100% и 78% выживаемость мышей WT и КО, получивших абсолютно летальную дозу РОХ 600 мкг/кг ( $\approx 1,2 LD_{50}$ ) и 550 мкг/кг ( $\approx 1,1 LD_{50}$ ), соответственно.

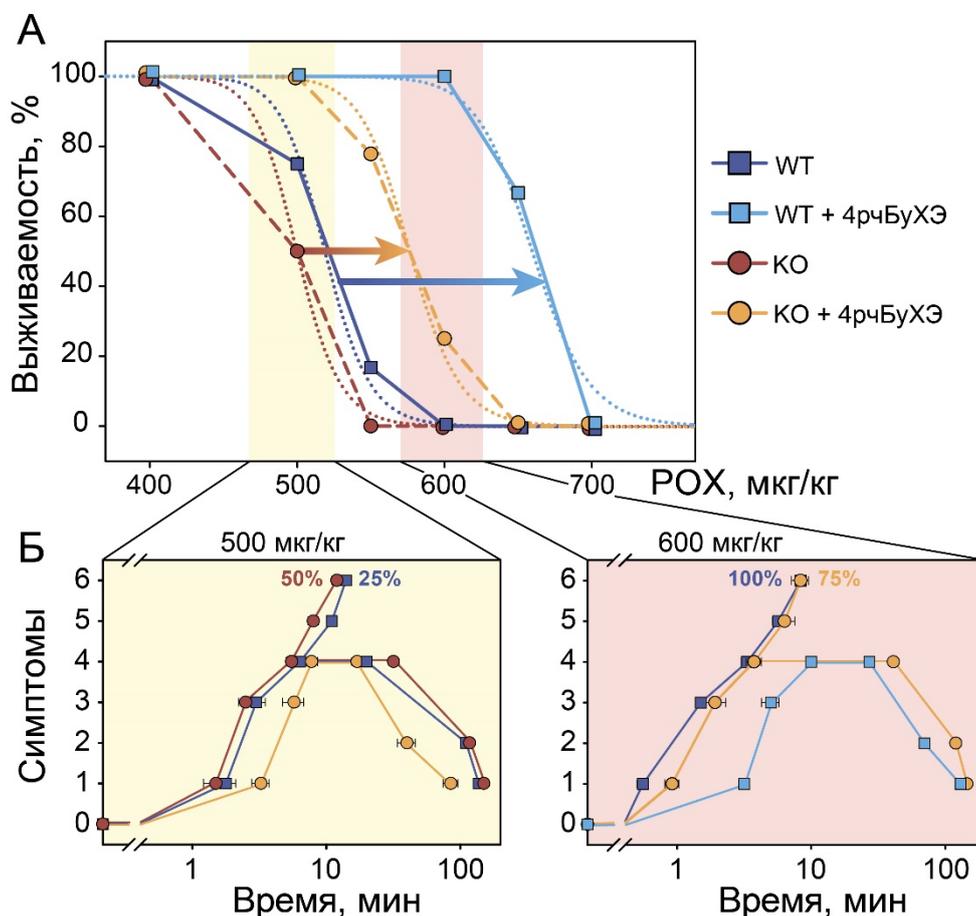


Рис. 8. (А) Выживаемость мышей дикого типа (WT), а также мышей, нокаутных по гену БуХЭ (КО), без терапии и с терапией 4рчБуХЭ. (Б) Тяжесть проявления симптомов отравления мышью, получивших РОХ в дозе 500 и 600 мкг/кг, во времени. 0 – отсутствие признаков; 1 – остановка двигательной активности и начало подъема в стойку после отравления; 3 – начало тремора; 2 – окончание тремора; 4 – проявление максимальных признаков отравления; 5 – кома; 6 – смерть.

### Скрининг антибактериальной активности в каплях микрофлюидной двойной эмульсии

Одним из наиболее привлекательных преимуществ разработанной платформы является ее биосовместимость, позволяющая осуществлять культивацию микроорганизмов в каплях микрофлюидной двойной эмульсии. Для изучения попарных межклеточных взаимодействий микроорганизмов была разработана модельная система, имитирующая взаимодействия между тремя различными видами бактерий, игравших роль “жертвы”, “убийцы” и “сожителя” (Рис. 9А).

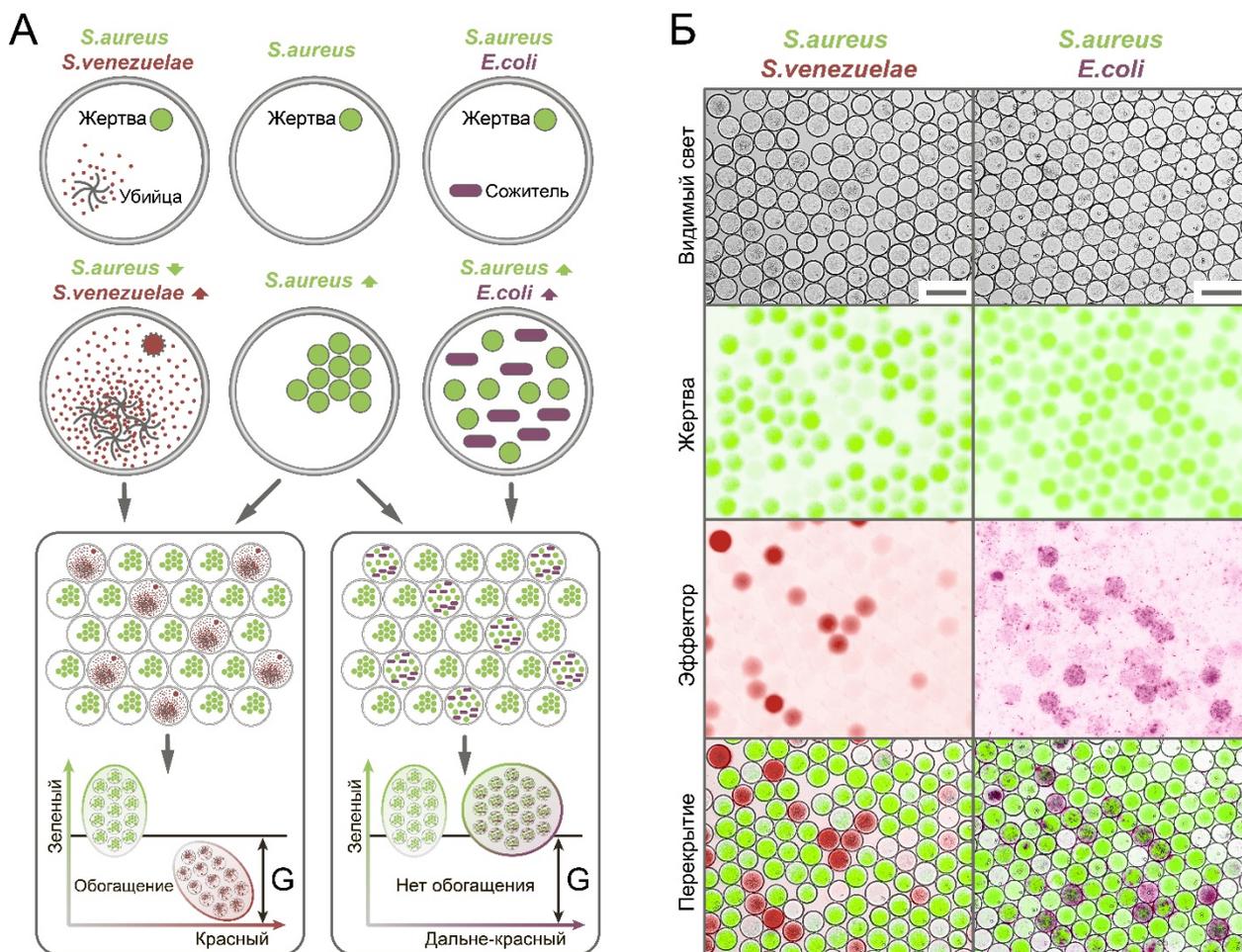


Рис. 9. (А) Схема скрининга попарных взаимодействий для отбора бактерий, ингибирующих рост *S. aureus*, в каплях биосовместимой двойной микрофлюидной эмульсии. (Б) Микроскопия капель, несущих смесь клеток *S. aureus*+*S. venezuelae* и *S. aureus*+*E. coli*. Микроскопия видимого света, флуоресцентная микроскопия *S. aureus* (жертва), *S. venezuelae* (эффектор слева) и *E. coli* (эффектор справа), шкала – 100 мкм.

Разработанная схема была использована для отбора бактерий-продуцентов антибиотиков, ингибировавших рост патогенных бактерий *Staphylococcus aureus*. Штамм *S. aureus*, конститутивно продуцирующий зеленый флуоресцентный белок-репортер, был использован в качестве “жертвы”. Бактерии *Streptomyces venezuelae*, продуцирующие антибиотик хлорамфеникол и ингибировавшие рост *S. aureus*, были выбраны в качестве “убийцы”. *S. venezuelae* продуцировали продигнины, обладавшие красной флуоресценцией, что было использовано для идентификации их наличия в каплях. В качестве нейтрального “сожителя”, не ингибировавшего рост *S. aureus*, были использованы клетки *E. coli*, продуцировавшие дальне-красный флуоресцентный белок-репортер *Katushka2S*. Таким образом, в том случае, если в одну каплю попадали клетки *S. aureus* и *S. venezuelae*, последние ингибировали рост *S. aureus* и заполняли собой весь объем капли, что приводило к образованию капли, обладавшей высоким уровнем красной и низким уровнем зеленой флуоресценции. В том случае, если в каплю попадали только клетки *S. aureus*, они делились неконтролируемо, что приводило к образованию капли с интенсивной зеленой флуоресценцией. Если же в каплю одновременно попадали клетки *S. aureus* и *E. coli*

обе бактерии делились, что приводило к каплям с высоким уровнем зеленой и дальне-красной флуоресценции. После кокультивации в каплях, отбор капель с наименьшим уровнем зеленой флуоресценции приводил к обогащению *S. venezuelae*, но не *E. coli* (Рис. 9Б). В случае негативной селекции наблюдалось обогащение убийц, но не сожителей. Было установлено, что отбор “убийц” с эффективностью, близкой к теоретическому максимуму, происходил лишь в случае, если их доля в популяции была больше 10%. В том случае, если доля *S. venezuelae* составляла менее 1%, эффективность обогащения стремительно падала, что было связано с наличием популяции пустых капель, а также капель, в которых не происходило деления *S. aureus* из-за их перехода в состояние персистенции или гибели.

В отличие от классической платформы Ваксмана, основанной на классическом скрининге колоний на чашках, разработанная микрофлюидная платформа позволяет осуществлять скрининг значительно большего биологического разнообразия, что было использовано для отбора бактерий, ингибирующих рост *S. aureus*, среди представителей микробиоты ротовой полости. Для этого разработанная ранее схема скрининга попарных взаимодействий в каплях была модифицирована двумя дополнительными флуоресцентными сигналами-репортерами (Рис. 10А). Клетки микробиоты ротовой полости подвергались микрофлюидной компартиментализации вместе с избытком клеток *S. aureus*, прижизненно меченых красным флуоресцентным красителем sCy5. Кокультивация *S. aureus* и эффекторов микробиоты приводила к четырем различным вариантам: I – эффектор ингибировал рост *S. aureus* и оставался живым в процессе кокультивации; II – эффектор и *S. aureus* погибали; III – эффектор и *S. aureus* сожительствовавали в капле и не ингибировали рост друг друга; IV – *S. aureus* ингибировал рост эффектора. Для того чтобы различить эти варианты, был использован голубой флуорогенный краситель метаболической активности Calcein Violet AM. Таким образом, отбор популяции капель, обладающих высоким уровнем красной, низким уровнем зеленой и высоким уровнем голубой флуоресценции, приводил к отбору капель с высокой изначальной загрузкой клетками *S. aureus*, которые не делились в каплях, в то же время в каплях присутствовали другие живые клетки, отличные от *S. aureus*.

Так как различные виды бактерий обладают разной скоростью роста и могут ингибировать рост друг друга на чашках, отобранные капли напрямую подвергались 16S рРНК и полногеномному (WGA) широкомасштабному секвенированию с целью идентификации медленно растущих и некультивируемых бактерий, ингибировавших рост *S. aureus* в каплях. Сравнение количества прочтений до и после отбора показало, что, как по результатам 16S рРНК (Рис. 10Б), так и результатам полногеномного секвенирования, *Propionibacterium acnes* обладали наибольшим обогащением среди всех бактерий. Методом 16S рРНК секвенирования было выявлено две субпопуляции бактерий-ингибиторов, отобранных с различной эффективностью. Бактерии родов *Propionibacterium*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, и *Escherichia* обладали наивысшим уровнем

обогащения. Бактерии *Corynebacterium*, *Janthinobacterium*, *Serratia*, *Enterobacter* и *Streptococcus* также были достоверно обогащены с более низкой степенью обогащения. *Streptococcus* представляли при этом популяцию наиболее распространенных ингибиторов *S. aureus* среди представителей микробиоты ротовой полости.

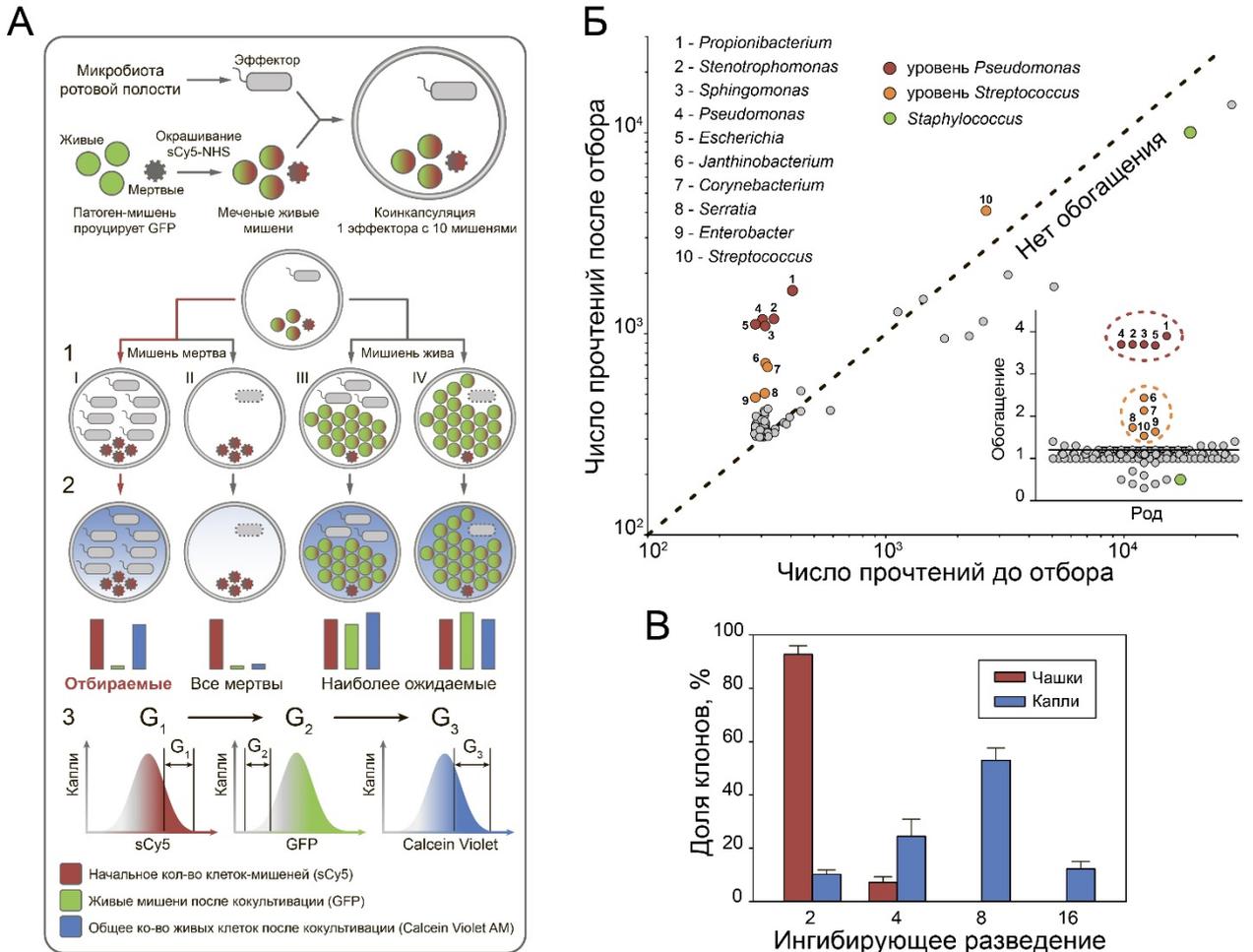
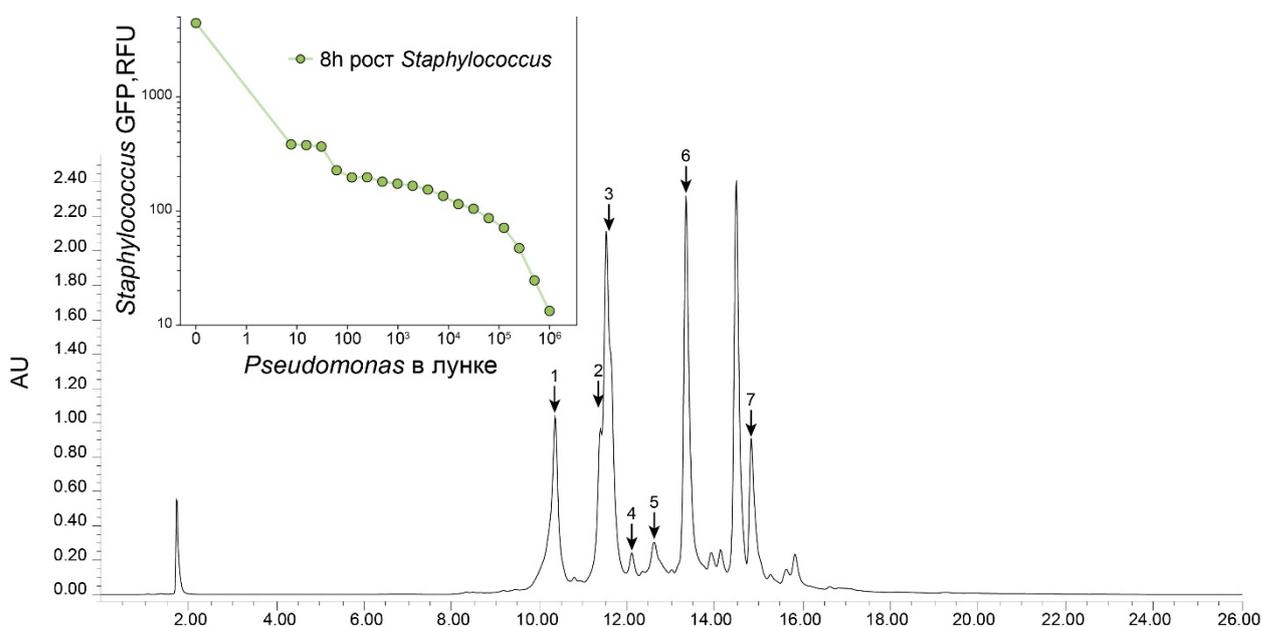


Рис. 10. (А) Усовершенствованная схема отбора бактерий, ингибирующих рост *S. aureus*, среди представителей микробиоты ротовой полости. (Б) Предсказание родов бактерий, ингибирующих рост *S. aureus*, по результатам 16S рРНК секвенирования. (В) Клоны стрептококков, отобранные с использованием микрофлюидной платформы (капли) демонстрировали значительно более эффективное ингибирование роста *S. aureus*, чем клоны полученные с использованием платформы Ваксмана (чашки).

Полногеномное секвенирование подтвердило чрезвычайно эффективное обогащение медленно растущих *Propionibacterium acnes*, также позволив идентифицировать некоторых бактерий-ингибиторов с точностью до вида. Группа *Streptococcus mitis* (*S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis* и *S. pseudopneumoniae*), *Prevotella dentalis* (медленно растущий вид), *Staphylococcus epidermidis* (известный эффектор *S. aureus*) и *Pseudomonas aeruginosa* были значительно обогащены после отбора. Отобранные капли подвергались культивации с целью идентификации культивируемых бактерий-ингибиторов *S. aureus*. Более 90% бактериальных колоний, отличных от *S. aureus*, регенерированных из капель на чашках,

принадлежали роду *Streptococcus* и более 64% из них были классифицированы при помощи масс-спектрометрии как *Streptococcus oralis*. Отобранные клоны в процессе роста продуцировали в ростовую среду метаболиты, ингибирующие рост *S. aureus*, причем *S. oralis* демонстрировали наибольшее ингибирующее разведение ростовой среды (вплоть до 16 кратного разведения). Анализ культивируемых клонов-ингибиторов *S. oralis*, полученных с использованием классического скрининга на чашках, и клонов, полученных в результате отбора с использованием капель, показал, что клоны, полученные с использованием капель, обладали значительно большим ингибирующим разведением ростовой среды (Рис. 10В).

Исключительно с использованием микрофлюидной платформы был отобран штамм *Pseudomonas aeruginosa*, полностью ингибирующий рост *S. aureus* в культуре даже при попадании единичных клеток *P. aeruginosa* (Рис. 11). Условно патогенные *P. aeruginosa* не являются нормальным компонентом микрофлоры ротовой полости и могли присутствовать среди представителей микробиоты ротовой полости лишь в концентрации <0.005%, что делало их отбор с использованием классической платформы Ваксмана практически невозможным.



Флуоресценция <i>S. aureus</i> после 10ч роста																					
С18 мин.	1,75	8,25	8,75	9,25	9,75	10,25	10,75	11,25	11,75	12,25	12,75	13,25	13,75	14,25	14,75	15,25	15,75	16,25	16,75	17,25	
Фракция #						1	2		3	4	5		6	7							
разведение																					
2X	418	300	360	315	277	8	172	3	4	3	3	4	4	3	4	4	4	9	50	489	
4X	1228	1318	1145	1190	1329	10	879	56	12	102	26	18	64	85	3	56	52	1243	927	1087	
8X	1690	1649	1577	1651	1891	27	1924	558	925	703	325	119	1035	821	187	951	924	1539	1170	1477	
16X	1958	1983	2054	1806	1785	311	1841	429	1634	401	326	390	1896	1099	1213	1780	1434	1708	1702	1982	
32X	2148	2756	2790	2454	2505	1672	2197	598	1852	947	354	1005	1434	1441	1462	1758	1754	2313	2110	1958	
64X	2323	2146	2383	2349	2282	1875	2339	1336	1944	1695	413	1577	1830	1788	1694	2257	1778	2246	2192	2168	

Рис. 11. *P. aeruginosa* ингибировали рост культуры *S. aureus* даже при попадании в нее единичных клеток *P. aeruginosa*. Фракционирование культуральной среды *P. aeruginosa*, ингибирующей рост *S. aureus*, и анализ активности полученных фракций.

В отличие от *S. oralis*, *P. aeruginosa* продуцировали вторичные метаболиты, ингибирующие рост *S. aureus*, не конститутивно, а индуцибельно в процессе кокультивации со *S. aureus*. Хлороформный экстракт ростовой среды *P. aeruginosa*,

полученной в результате кокультивации *P. aeruginosa* и *S. aureus* и ингибировавшей рост *S. aureus*, был фракционирован с использованием высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии. *P. aeruginosa* продуцировали широкий спектр вторичных метаболитов, ингибировавших рост *S. aureus*. Фракции 1 и 6 демонстрировали высокоэффективное синергическое ингибирование, приводившее к гибели *S. aureus* (Рис. 12А).

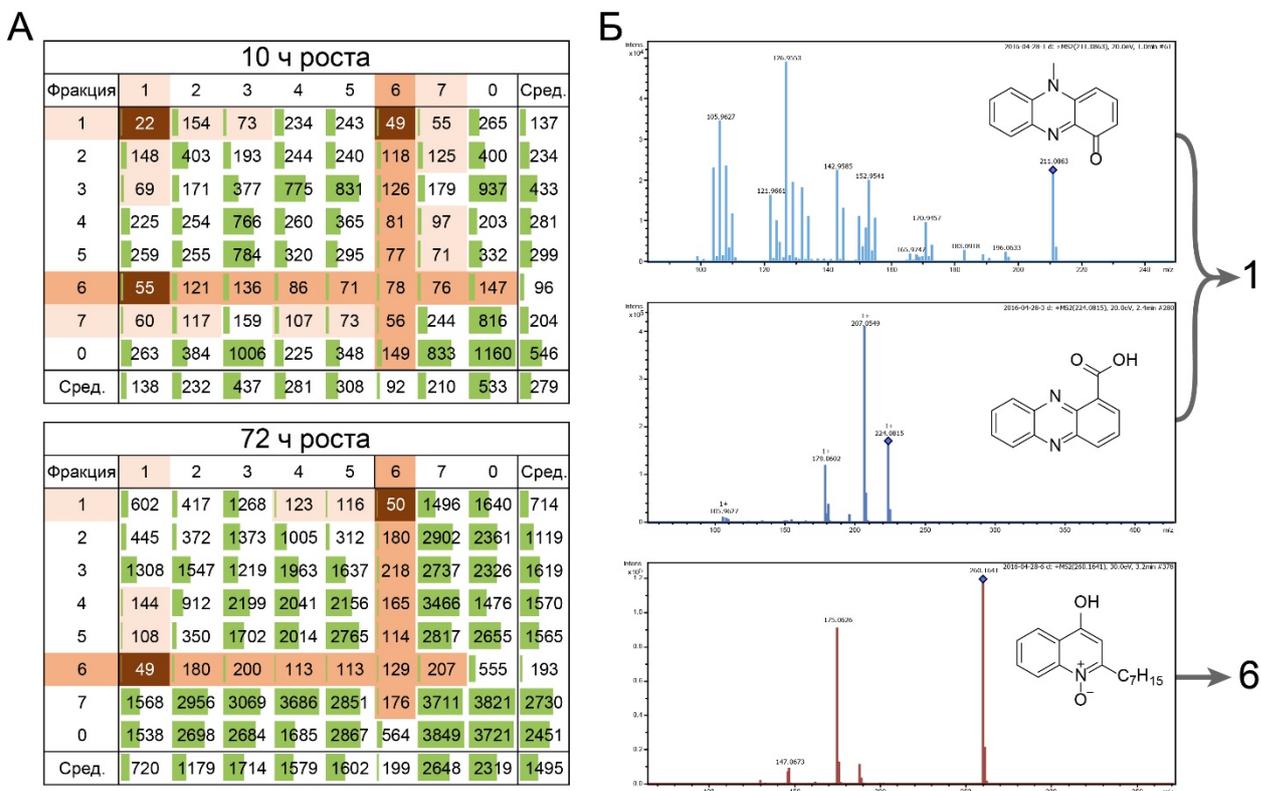


Рис. 12. (А) Синергическое ингибирование роста *S. aureus* фракциями 1 и 6, полученными в результате фракционирования с использованием высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии. (Б) Основные действующие вещества фракций 1 и 6, идентифицированные с использованием масс-спектрометрии.

Основными действующими веществами, идентифицированными с помощью масс-спектрометрии (Рис. 12Б), были пиоцианин и феназин-1-карбоновая кислота (фракция 1) и 2-гептил-4-гидроксихинолин N-оксид (фракция 6). Пиоцианин и феназин-1-карбоновая кислота являются ингибиторами каталазы, а также выступают в роли переносчиков электронов электрон-транспортной цепи, вызывая продукцию активных форм кислорода, в то время как 2-гептил-4-гидроксихинолин N-оксид вызывает ингибирование пути окисления гидрохинонов. Таким образом, *P. aeruginosa* контролируют рост *S. aureus* за счет использования синергических механизмов, направленных, в первую очередь, на индукцию окислительного стресса *S. aureus*, приводящего к остановке деления и гибели *S. aureus*.

## ВЫВОДЫ

1. Создана платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антибактериальной активности в каплях двойной микрофлюидной эмульсии. Разработанная платформа была использована для высокоэффективного прижизненного отбора биокаталитической и антимикробной активности единичных клеток из популяций активных клеток представительностью 0.001% и <0.005% соответственно за один раунд селекции. Высокая селективность и чувствительность платформы позволили различить различные типы активности, а также различные уровни одинаковой активности.
2. Разработанная платформа позволила найти новые мутанты рчБуХЭ, демонстрирующие повышенную устойчивость к инактивации ФОТ, используя один раунд отбора из библиотеки мутантов ацил-связывающей петли, обладающей представительностью  $\approx 3 \times 10^5$ . Устойчивость отобранных мутантов к ингибированию ФОТ была обусловлена не только снижением реакционной способности к ФОТ, но и, что более важно, возникновением новой каталитической активности, связанной с гидролизом ФОТ.
3. Используя подходы, основанные на *in vivo* тетрамеризации БуХЭ, впервые были получены экспрессионные вектора для продукции олигомерно чистой 4рчБуХЭ, обладающей периодом полувыведения, улучшенным более чем в 10 раз по сравнению с рчБуХЭ и в 2 раза по сравнению с конъюгатом рчБуХЭ-ПСА. Полученный препарат 4рчБуХЭ обладал низким накоплением в тканях, основным компартментом ответственным за его биodeградацию являлась печень, а низкомолекулярные продукты биodeградации выводились почками с мочой.
4. Используя модельную систему, основанную на кокультивации бактерий в каплях, был осуществлен скрининг индивидуальных попарных клеточных взаимодействий. Разработанная платформа позволила выявить представителей микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост *S. aureus*. Использование широкомасштабного секвенирования для анализа отобранных бактерий-ингибиторов *S. aureus* позволило без культивации предсказать бактерии-ингибиторы *S. oralis* и *P. aeruginosa*, которые были впоследствии отобраны в результате культивирования капель и демонстрировали продукцию метаболитов, ингибировавших рост *S. aureus in vitro*. 16S и полногеномное широкомасштабное секвенирование также предсказало высокоэффективное обогащение медленно растущих *Propionibacterium acnes*, которых было невозможно идентифицировать в результате высева микробиоты ротовой полости ввиду их чрезвычайно низкой скорости деления. Метаболомный анализ показал, что *P. aeruginosa* высокоэффективно ингибируют рост *S. aureus* за счет продукции вторичных метаболитов, обладающих синергическим действием, направленным на индукцию окислительного стресса.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи:

1. Терехов С.С., Бобик Т.В., Мокрушина Ю.А., Степанова А.В., Александрова Н.М., Смирнов И.В., Белогуров А.А., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. Экспрессия ДНК-кодированного антидота к фосфорорганическим токсинам в мейотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. С. 162-169.
2. Terekhov S., Smirnov I., Bobik T., Shamborant O., Zenkova M., Chernolovskaya E., Gladkikh D., Murashev A., Dyachenko I., Palikov V., Palikova Y., Knorre V., Belogurov Jr. A., Ponomarenko N., Blackburn G. M., Masson P., Gabibov A. A novel expression cassette delivers efficient production of exclusively tetrameric human butyrylcholinesterase with improved pharmacokinetics for protection against organophosphate poisoning. // Biochimie. 2015. V. 118. P. 51-59.
3. С. С. Терехов, И. В. Смирнов, О. Г. Шамборант, Т. В. Бобик, Д. Г. Илюшин, А. Н. Мурашев, И. А. Дьяченко, В. А. Паликов, В. Д. Кнорре, А. А. Белогуров, Н. А. Пономаренко, Е. С. Кузина, Д. Д. Генкин, Р. Masson, А. Г. Габибов. Химическое полисиалирование и *in vivo* тетрамеризация улучшают фармакокинетические характеристики биологических антидотов на основе рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека. // Acta Naturae. 2015. Т. 7. С. 136-141.
4. С. С. Терехов, И. В. Смирнов, О. Г. Шамборант, М. А. Зенкова, Е. Л. Черноловская, Д. В. Гладких, А. Н. Мурашев, И. А. Дьяченко, В. Д. Кнорре, А. А. Белогуров, Н. А. Пономаренко, С. М. Деев, В. В. Власов, А. Г. Габибов. Создание высокоэффективного флуоресцентного зонда для изучения биодеградации фармакологических белковых препаратов *in vivo*. // Acta Naturae. 2014. Т. 6. С. 54-59.

### Опубликованные тезисы и доклады конференций:

1. С.С. Терехов, А.А. Степанова, Т.В. Бобик, Н.А. Пономаренко, И.В. Смирнов. Использование биосовместимых микрофлюидных двойных эмульсий для скрининга ферментативной активности на уровне единичных клеток. Постер. V съезд биохимиков России, 2016, Дагомыс, Россия.
2. S. Terekhov, A. Stepanova, O. Kartseva, I. Smirnov. Inhibition of the recombinant human butyrylcholinesterase with paraoxon and coumarin analog of soman. Poster. 41th FEBS, 2016, Kusadasi, Turkey.
3. С.С. Терехов, И.В. Смирнов, Т.В. Бобик, Н.А. Пономаренко, А.Г. Габибов. Использование системы высокопроизводительного скрининга в микрофлюидных двойных эмульсиях для отбора биокатализаторов. Доклад. XXVIII зимняя молодежная научная школа, 2016, Москва, Россия.
4. S. Terekhov, I. Smirnov, O. Shamborant, M. Zenkova, E. Chernolovskaya, I. Dyachenko, N. Ponomarenko, P. Masson, A. Gabibov. Expression and production of exclusively tetrameric human butyrylcholinesterase with improved pharmacokinetics

- for protection against organophosphate poisoning, making a long-leaving biopharmaceutical. Poster. 12th ChE-6PON, 2015, Elche, Spain.
5. Smirnov I.V., Terekhov S.S., Shamborant O.G., Bobik T.V., Dyachenko I.A., Palikov V., Ponomarenko N.A., Gabibov A.G. Production of the recombinant tetrameric butyrylcholinesterase with improved pharmacokinetic properties for the protection against organophosphate poisoning. Poster. 40th FEBS, 2015, Berlin, Germany.
  6. С.С. Терехов, О.Г. Шамборант, Т.В. Бобик, И.В. Смирнов, Н.А. Пономаренко, А.Г. Габибов. Новый подход к получению бутирилхолинэстеразы человека с улучшенными фармакокинетическими свойствами для терапии отравлений фосфорорганическими токсинами. Доклад. XXVII зимняя молодежная научная школа. 2015, Москва, Россия.
  7. С.С. Терехов, О.Г. Шамборант, Т.В. Бобик, И.В. Смирнов, Н.А. Пономаренко, А.Г. Габибов. Экспрессия тетрамерной рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека. Постер. XXVI зимняя молодежная научная школа. 2014, Москва, Россия.