

УДК 579.24+577.171.5+57.05

ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ПРОФИЛЕЙ ПЛАНКТОННЫХ КУЛЬТУР И БИОПЛЕНОК *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*, ВЫРАЩЕННЫХ В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ В ПРИСУТСТВИИ ГОРМОНА CNP¹

© 2024 г. А. В. Ганнесен^{а, *}, Р. Х. Зиганьшин^б, М. А. Овчарова^а,
А. М. Мосолова^а, Н. А. Логинова^а, Е. В. Дювенжи^а, Е. Д. Неволлина^а,
С. В. Мартянов^а, В. К. Плакунов^а

^аФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071, Россия

^бИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, 117997, Россия

*e-mail: andrei.gannesen@gmail.com

Поступила в редакцию 18.06.2024 г.

После доработки 22.07.2024 г.

Принята к публикации 22.07.2024 г.

Натрийуретические пептиды (natriuretic peptides, NP) способны влиять на биопленки микроорганизмов-комменсалов человека, в том числе на представителей рода *Staphylococcus*, однако в литературе отсутствуют данные о молекулярных изменениях, вызываемых данными гормонами на посттрансляционном уровне. В связи с этим в настоящей работе впервые показано, что натрийуретический пептид С-типа (CNP) вызывает большие изменения в белковых профилях клеток и биопленок стафилококка. Присутствие гормона приводит к более выраженному различию в белковых профилях между планктонными клетками и биопленками при сравнении с контрольными парами образцов. Основные процессы, которые при этом затрагиваются – ЦТК, транспорт белков, синтез пуринов (понижение количества соответствующих белков в биопленках) и метаболизм нитрата (повышение количества нитрогеназа и других белков в биопленках). Необходимо отдельно упомянуть понижение количества лизоцифина в биопленках по сравнению с планктонными культурами при воздействии CNP. Возможно, это один из потенциальных механизмов показанного недавно понижения конкурентных свойств *S. epidermidis* в сообществе с другими микроорганизмами, которое индуцируется наличием в среде CNP. Кроме того, результаты исследования укрепляют гипотезу о том, что, как и в случае других гормонов человека, действие CNP на *S. epidermidis* является мультитаргетным. Одним из вероятных механизмов действия гормона может быть нарушение перехода от планктонной культуры к биопленке без подавления роста клеток, что нуждается в дальнейшей проверке.

Ключевые слова: *Staphylococcus epidermidis*, гормоны, натрийуретические пептиды, натрийуретический пептид С-типа, биопленки, микробная эндокринология, протеомика, масс-спектрометрия методом орбитальной ловушки

DOI: 10.31857/S0026365624060072

В настоящее время данных о воздействии гормонов человека на рост микроорганизмов и их биопленок накоплено достаточно, для того чтобы утверждать, что потенциально любой человеческий гормон является эффектором для любого микроорганизма. Недавний обзор Luqman достаточно подробно систематизирует имеющиеся данные по эффектам основных классов гормонов на самые

различные микроорганизмы (Luqman, 2023). Неудивительно, что микробная эндокринология становится все более популярным направлением исследований по всему миру: появляются новые коллективы, занимающиеся вопросами воздействия гормонов на микробиоту человека, развиваются новые направления, такие как, к примеру, влияние гормонов на чувствительность бактерий к антибиотикам

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060072>

(Kalaycı-Yüksek et al., 2021; Kalaycı-Yüksek et al., 2022; Louis et al., 2022; Diuvenji et al., 2023).

Натрийуретические пептиды (natriuretic peptides, NP) представляют собой небольшие пептиды, имеющие в своем составе кольцообразную структуру, замкнутую дисульфидным мостиком между двумя остатками цистеина (Potter et al., 2009). Они выполняют множество регуляторных функций в организме человека. В частности, натрийуретический пептид С-типа (CNP), состоящий из 22 аминокислот и синтезирующийся в клетках сердца и эндотелия сосудов (в т.ч. капилляров), является одним из важных регуляторов кровяного давления и тонуса сосудов, а также веществом, защищающим от различных сердечных заболеваний, в том числе гипертрофии сердца (Lumsden et al., 2010). Относительно недавно началось постепенное накопление данных о NP как о молекулах, оказывающих эффект на микроорганизмы и, в особенности, на их биопленки. Так, подобный аспект активности NP начал системно исследоваться коллективом под руководством профессора Марка Фейоле (а именно профессора Лезуатье и его коллег, начавших изучение действия CNP на псевдомонады; Veron et al., 2007). В дальнейшем в ходе исследований было показано, что NP способны не только каким-либо образом влиять на моновидовые биопленки микроорганизмов, но и регулировать простейшие бактериальные сообщества — двухвидовые биопленки (Ганнесен и соавт., 2018; Gannesen et al., 2018; Ovcharova et al., 2021; Ovcharova et al., 2023; Дювенжи и соавт., 2022). В частности, показано, что натрийуретические пептиды А- и С-типов способны усиливать конкурентные преимущества *Cutibacterium acnes* относительно *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* в составе двухвидовых биопленок (Ганнесен и соавт., 2018; Gannesen et al., 2018; Ovcharova et al., 2021; Ovcharova et al., 2023). При этом, если в случае сообщества кутибактерий и эпидермального стафилококка эффект гормонов выражается, в том числе в изменении количества биомассы биопленок и экспрессии генов (Ovcharova et al., 2021, Ovcharova et al., 2023), то в случае золотистого стафилококка эффект может быть менее выраженным при пониженных концентрациях гормона. Иногда этот регуляторный эффект может не обнаруживаться традиционными методами, такими как окраска биопленок с помощью кристаллического фиолетового, однако при этом все равно NP оказывают эффект на микроорганизмы. Данное явление было показано на сообществе *S. aureus* и другого кожного микроорганизма *Kytococcus schroeteri*, при этом также эффект натрийуретического пептида А-типа (ANP) на *S. aureus* зависит от присутствия второго микроорганизма — *K. schroeteri* — в сообществе (Дювенжи и соавт., 2022). Французскими коллегами было высказано предположение, что бактерии потенциально могут

обладать рецепторами натрийуретических пептидов, сходными с таковыми у человека, например, это было предположено для *Pseudomonas aeruginosa* и CNP (Rosay et al., 2015). Функцию амидазы AmiC как ортолога рецептора натрийуретических пептидов недавно продемонстрировал коллектив исследователей (Louis et al., 2023), показавший взаимодействие данного белка с остеокином (агонист рецепторов натрийуретических пептидов у человека) и важность присутствия самого пептида для запуска целого каскада биохимических реакций в клетках *P. aeruginosa*. Однако механизм воздействия пептидов на микроорганизмы по-прежнему требует глубокого изучения.

Последние исследования показывают, что гормоны способны изменять чувствительность микроорганизмов к антибиотикам, что весьма перспективно с точки зрения медицинской микробиологии. Так показано, что стероидные гормоны прогестерон и эстрадиол влияют на чувствительность *S. aureus* к ципрофлоксацину и гентамицину (Kalaycı-Yüksek et al., 2023). Показано снижение минимальных ингибиторных концентраций гентамицина и ципрофлоксацина у *S. aureus* и *P. aeruginosa* (в моновидовых и двухвидовых культурах) в присутствии мелатонина и норадреналина (Kalaycı-Yüksek et al., 2021). ANP в зависимости от концентрации меняет чувствительность моновидовых и двухвидовых биопленок *S. aureus* и *K. schroeteri* к азитромицину (Diuvenji et al., 2023), а также изменяет чувствительность *P. aeruginosa* к имипенему, полимиксину В и тобрамицину (Louis et al., 2022). Таким образом, натрийуретические пептиды обладают достаточным потенциалом для дальнейшего исследования в качестве потенциальных адъювантов антибиотиков.

S. epidermidis является одним из наиболее представленных микроорганизмов-комменсалов кожи человека, предпочитающим увлажненные, богатые потовыми железами участки кожи (Grise et al., 2009). Вместе с *Cutibacterium acnes* — еще одним грамположительным микроорганизмом — *S. epidermidis* считается некоторыми исследователями одним из основных акторов, поддерживающих гомеостаз кожной микробиоты, во многом определяющим состояние кожи (Fourniere et al., 2020).

Ранее было исследовано влияние CNP на сообщество *C. acnes* и *S. epidermidis*. Мы показали изменения структуры моновидовых и двухвидовых биопленок, изменения экспрессии генов и конкурентных свойств микроорганизмов в присутствии гормона (Ovcharova et al., 2023).

Целью настоящей работы было исследование белковых профилей планктонных культур и биопленок *S. epidermidis* в присутствии CNP в анаэробных условиях, подобных тем, в которых выращивали сообщества с *C. acnes*, для понимания характера изменений в клетках на уровне трансляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Штамм и культивирование. *S. epidermidis* ATCC14990 хранили на столбиках с полужидким лизогенным бульоном (lysogeny broth, LB, “Диаэм”, Россия). Для экспериментов производили рассев на чашки с агаризованной средой LB до отдельных колоний. Затем биомассу колонии засеивали в колбу с 20 мл жидкой LB и культивировали 24 ч при 33°C на качалке (150 об./мин). Посевной материал доводили до оптической плотности 0.5 при длине волны 540 нм стерильным физиологическим раствором (ФР, 0.9% хлорида натрия в дистиллированной воде). Подготовленные таким образом культуры использовали в экспериментах.

Активное соединение. Гормон CNP (“Alfa-Aesar”, США) растворяли в стерильной MilliQ-воде (MQ) и хранили при –20°C. В экспериментах стоковый раствор разбавляли стерильной MQ-водой до необходимой концентрации и добавляли в среду.

Выращивание планктонных культур и биоопенок. Для анаэробного культивирования планктонных культур в центрифужные пробирки объемом 50 мл (“Falcon”, США) помещали 50 мл жидкой обогащенной клостридиальной среды (reinforced clostridial medium, RCM) следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт (“Диаэм”, Россия) – 13, пептон (“Диаэм”, Россия) – 10, глюкоза (“Диаэм”, Россия) – 5, хлорид натрия (“Диаэм”, Россия) – 5, ацетат натрия (“Реахим”, Россия), крахмал (“Диаэм”, Россия) – 1, гидрохлорид цистеина (“Biomerieux”, Франция) – 0.5; pH 7.0. Затем вносили необходимый объем раствора гормона до конечной концентрации 2.7 пМ и 1 мл подготовленной культуры. 2.7 пМ является нормальной концентрацией в плазме крови человека (Ikeda et al., 2000). Контрольные образцы были без добавок. Образцы инкубировали при 33°C в течение 24 или 72 ч. После культивирования биомассу осаждали центрифугированием при 4000 g, дважды промывали ФР и переходили к выделению белков.

Биопленки выращивали на целлюлозных подложках (“Озон”, Россия). Кружки из целлюлозной пленки диаметром, равным диаметру чашки Петри, вырезали и автоклавируют при 1 атм

в течение 30 мин. В чашки разливали по 20 мл агаризованной (1.5%) среды RCM с добавлением гормона или без него; после застывания среды располагали на ее поверхности целлюлозную пленку. На поверхность пленки наносили 0.5 мл посевного материала и распределяли по поверхности шпателем. Чашки инкубировали анаэробно в системе GasPak (“BD”, США) с газогенерирующими пакетами Анаэрогаз (“Биом”, Россия), в течение 24 или 72 ч. Далее биомассу собирали в 2 мл микроцентрифужные пробирки (“Eppendorf”, Германия) и приступали к выделению белков.

Выделение белков. Каждый образец биомассы биоопенок или планктонных культур ресуспендировали в стерильном ФР и доводили оптическую плотность суспензии до 1 при длине волны 600 нм. 10 мл подготовленных суспензий осаждали центрифугированием при 4000 g и комнатной температуре в течение 30 мин, после чего пеллеты ресуспендировали в 600 мкл лизирующего буфера (табл. 1), как описано ранее (Gannesen et al., 2023).

Затем суспензии переносили в 2 мл пробирки для лизиса, содержащие лизирующую матрицу В (“MP Biomedicals”, США). Биомассу разрушали с помощью прибора-дезинтегратора FastPrep (“MP Biomedicals”, США) на скоростном режиме 6 в течение 20 с пять раз подряд. Затем пробирки центрифугировали при 13000 g в течение 1 мин для осаждения остатков клеток и абразива. Выделение белков контролировали с помощью метода Брэдфорд.

Масс-спектрометрический анализ белков. Анализ протеома проводили, как описано ранее (Gannesen et al., 2023). Белки после лизиса биомассы осаждали ацетоном. К объему лизата, содержащего 2 мкг белков, добавляли 5 объемов ледяного (–20°C) ацетона (“Merck”, Германия), после чего смесь встряхивали на вортексе и оставляли на ночь при –20°C. Затем образцы центрифугировали при 15000 g при 4°C в течение 15 мин, суператант отбрасывали, пеллеты сушили под вакуумом при комнатной температуре.

Восстановление, алкилирование и расщепление белков в растворе проводили, как описано ранее (Kulak et al., 2014), с минимальными изменениями. Буфер для лизиса, восстановления

Таблица 1. Состав лизирующего буфера

Реактив	Объем	Конечная концентрация
Трис-буфер (10×, pH 7.5) – Трис-основание 0.198 M, NaCl 1.51 M; pH 7.5 доводили 1 M HCl	5 мл	1×
ЭДТА (0.5 M)	100 мкл	0.001 M
Тритон X100 10%	5 мл	1%
Фенилметансульфонилфторид (ФМСФ) 10 mM в этаноле	1 мл	0.2 mM
H ₂ O	38.9 мл	

и алкилирования, содержащий 1% (масс-объемный) деоксихолата натрия (ДХН), 100 мМ трис-буфера (pH 8.5), 10 мМ трис-(2-карбоксиэтил)фосфина (ТКЭФ) и 20 мМ 2-хлороацетамида, добавляли к образцам биомассы. Образцы нагревали до 95°C и выдерживали 10 мин. Далее образцы охлаждали, добавляли объем, равный объему каждого образца, 1% (по массе) раствора трипсина в 100 мМ трис-буфере (pH 8.5). Образцы выдерживали при 37°C в течение ночи, после чего подкисляли 1% трифторуксусной кислотой (ТФУ) для связывания с полистирендивинилсульфонатом с обращенной фазой. 20 мкг образца загружали на три наконечника-колонок, добавляли равный объем этилацетата, после чего колонки центрифугировали при 400 g. После отмывания колонок с помощью 100 мкл смеси 1% ТФУ с этилацетатом и последующего отмывания 0.2% ТФУ, пептиды элюировали в 50 мкл элюирующего раствора, содержащего 50% ацетонитрила, 45% воды и 5% аммония. Собранный материал высушивали под вакуумом и хранили при -80°C. Перед анализом пептиды растворяли в 2% растворе ацетонитрила в 0.1% ТФУ и обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой ванне в течение 2 мин.

Для масс-спектрометрии образцы загружали в самодельные колонки 20 × 0.1 мм, заполненные сорбентом Intersil ODS3F ("GL Sciences", Япония) в загрузочном буфере (2% ацетонитрила, 98% воды, 0.1% ТФУ) при скорости потока 10 мкл/мин. Пептиды разделяли при комнатной температуре на колонках из плавленого кремнезема размером 300 × 1 мм, заполненных наполнителем ReproSil-Pur ("Dr. Maisch", Германия; Kovalchuk et al., 2019), и собирали в эмиттер, изготовленный с использованием пуллера P2000 Laser Puller ("Sutter", Atlanta, США). Обращенно-фазовую хроматографию выполняли с использованием системы Ultimate 3000 Nano LC ("ThermoFisher", США), которая была соединена с масс-спектрометром Q Exactive Plus Orbitrap ("ThermoFisher", США) через источник наноэлектрораспыления ("ThermoFisher", США). Пептиды помещали в загрузочный раствор (98% 0.1%-ной (об./об.) муравьиной кислоты, 2% (об./об.) ацетонитрила) и элюировали с использованием линейного градиента: 3–35% раствор Б (0.1% (об./об.) муравьиная кислота, 80% (об./об.) ацетонитрил) в течение 105 мин; 35–55% Б в течение 18 мин, 55–99% Б в течение 6 с, 99% Б в течение 10 мин, 99–2% Б в течение 6 с при скорости потока 500 нл/мин. После каждого градиента колонку повторно заполняли раствором А (0.1% (об./об.) муравьиной кислоты, 2% (об./об.) ацетонитрила) в течение 10 мин. Параметры масс-спектрометрии-1 были следующими: разрешение 70К, диапазон сканирования 350–2000; максимальное время инъекции – 30 мс; целевая автоматическая регулировка усиления (APU), 3 × 10⁶. Ионы выделяли в пределах окна 1.4 *m/z* (масса к заряду) с предпочтительным

совпадением пептидов и исключением изотопов. Динамическое исключение было установлено на 30 с. Фрагментация масс-спектрометрии-2 выполнялась в режиме HCD с разрешением 17.5К с энергией столкновения HCD (высокоэнергетическая диссоциация, вызываемая столкновениями ионов; higher-energy collisional dissociation) 29%, максимальным временем инъекции 80 мс, целевым значением APU 1 × 10⁵. Другие настройки: исключение начислений – не назначено, 1, >7.

Необработанные спектры обрабатывали с помощью MaxQuant 1.6.6.0 (Tyanova et al., 2016a) и Perseus (Tyanova et al., 2016b). Анализ в MaxQuant выполняли с набором параметров по умолчанию, включая специфичность трипсин/р-протеазы, максимум 2 пропущенных расщепления, окисление метионина, ацетилирование N-конца белка и дезамидирование NQ в качестве переменных модификаций и карбамидометилирование цистеина в качестве фиксированной модификации, максимум 5 модификаций на каждый пептид, 1% совпадений между пептидами и показатель частоты ложных открытий (false discovery rate, FDR). Все запуски были проанализированы как независимые эксперименты и обработаны в Perseus.

В Perseus результаты групп белков были отфильтрованы на наличие примесей, на наличие обратных последовательностей, отброшены результаты "идентифицированы только по определенному участку". Использовались только белки со значениями maxLFQ как минимум в 3 из 7 анализов на жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Для них недостающие значения были рассчитаны из нормального распределения с шириной параметра сигма-распределения интенсивности 0.3 и смещением центра распределения интенсивности вниз на 1.8.

Анализ протеома *in silico*. Частичную визуализацию белковых кластеров осуществляли с использованием онлайн-ресурса Protein-Protein Interaction Networks Functional Enrichment Analysis STRING (https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bJepuA5XwxFl&input_page_show_search=off). Онлайн-анализ белков проводился с использованием базы данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>) и белка NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

Статистическая обработка результатов. Опыты проводили в трех независимых повторах. Статистическую обработку результатов вели с помощью программного обеспечения GraphPad PRISM 8.3.0. Для проверки достоверности различий использовали множественный *t*-критерий с дополнительным параметром "SD assuming (more power)". Коррекцию с учетом средней доли ложных отклонений гипотезы (false discovery rate, FDR) проводили с использованием встроенной функции "two-stage step-up integrated method of Benjamini, Krieger and

Yekutieli” (Benjamini et al., 2006). Статистически значимо изменившимся считали количество тех белков, которые воспроизводимо изменялись одинаковым образом (количество уменьшалось или увеличивалось) во всех статистических повторениях. Поскольку, как было показано ранее, при воздействии гормона количество белков может изменяться на небольшую величину, но при этом статистически воспроизводимо (Gannesen et al., 2023), а также поскольку эффекты гормонов зачастую являются небольшими количественно, но статистически значимыми (Gannesen et al., 2021; Дювенжи и соавт., 2022), было принято считать значимым любое статистически достоверное различие.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование изменений белкового состава планктонных клеток *S. epidermidis* в зависимости от времени культивирования. Вначале сравнивали 72-часовые планктонные культуры с 24-часовыми без добавления гормона. В 72-ч планктонных было обнаружено 28 белков в измененном количестве относительно 24-ч культур, среди которых 16 белков были в пониженном количестве, а 12 — в повышенном (табл. S1). Среди белков в пониженном количестве были различные ферменты; кластеризация с помощью онлайн-сервиса STRING (рис. 1.) позволила выявить два предположительных кластера белков (рис. 1А).

Первый кластер — это потенциально связанные друг с другом белки неизвестной функции — предположительные Zn-зависимые дегидрогеназы и PhnB-подобные белки. Второй кластер включал в себя белок S9 малой субъединицы рибосом и фактор инициации трансляции If-3, который связывается с 30S-субъединицей, сдвигая равновесие от целых рибосом в сторону отдельных субъединиц и увеличивая количество готовых для инициации малых субъединиц рибосом. Среди белков в повышенном количестве в 72-ч контрольных образцах каких-либо кластеров обнаружено не было (рис. 1Б), при этом в основном были представлены ферменты синтазы и транспортные белки, а также белок холодового шока CspA.

При культивировании планктонных культур в присутствии CNP количество белков, которое изменилось в ходе культивирования, увеличилось относительно контрольных образцов и составило 35, из которых 16 были в пониженном количестве, а 19 — в повышенном (табл. S1). Интересно, что среди этих белков только 6 (два в пониженной и 4 в повышенной) совпадали с таковыми в контролях (отмечены стрелками ↓ в табл. S1), что говорит о серьезных изменениях, вызываемых гормоном. STRING-анализ выявил три кластера белков в пониженной концентрации

(рис. 1В). Первый из них (отмечен цифрой 3) состоит из белка рибосом L7/L12, формирующего стебелек на рибосоме, облегчающий взаимодействие с ГТФ-связанными факторами трансляции, и белка DltC — переносчика остатков D-аланила (как правило, переносит его на липотейхоевые кислоты). Второй кластер (цифра 4 на рис. 1В) включает в себя белки экскреции других белков, которые также, вероятно, участвуют в кворум-сенсинге. Наконец, третий кластер (цифра 5) состоит из белков, участвующих в метаболизме липидов-триглицеридов. Таким образом, CNP влияет на экспорт белков, синтез белков и метаболизм липидов в планктонных клетках *S. epidermidis*. Если говорить о белках, количество которых увеличилось в ходе длительного культивирования, то стоит отметить появление большего количества белков процессинга нуклеиновых кислот. Также выявлены кластеры белков синтеза фолата и циклофилинподобных белков (рис. 1Г). Интересно также, что почти в 100 раз повышается содержание в клетках лизостафина, количество которого не изменялось в контрольных образцах. Таким образом, возможно, в присутствии гормона стафилококк накапливает лизостафин в клетках, что может быть связано со снижением количества белков-экспортеров. CNP, вероятно, может понижать конкурентные свойства стафилококка, вынуждая его накапливать весь лизостафин внутри клеток, что может быть объяснением повышения роста *Cutibacterium acnes* в сообществе с *S. epidermidis*, показанного ранее (Ovcharova et al., 2023), однако данная гипотеза нуждается в непосредственной экспериментальной проверке.

Исследование изменений белкового состава биопленок *S. epidermidis* в зависимости от времени культивирования. Исследование биопленок без добавления гормона показало изменение количества 28 белков, из которых количество 11 снижалось, а 17 — повышалось в 72-ч биопленках по сравнению с 24-ч биопленками (табл. S2). При этом, только три изменившихся белка (один в пониженном количестве и два в повышенном) совпадали с таковыми в планктонных культурах, что лишний раз доказывает важность развития биопленочного фенотипа для метаболизма микроорганизмов. Количественному изменению подверглись самые различные по функциям белки, в основном ферменты и транспортные белки. STRING-кластеризация выявила среди белков в понизившемся количестве только кластер транспортных белков, включающий уже наблюдавшийся ранее в планктонных культурах в присутствии CNP транспортный белок SecD (кластер обозначен цифрой 1 на рис. 2А).

Однако при этом не наблюдали накопления лизостафина в клетках. Среди белков в увеличенном количестве был обнаружен кластер

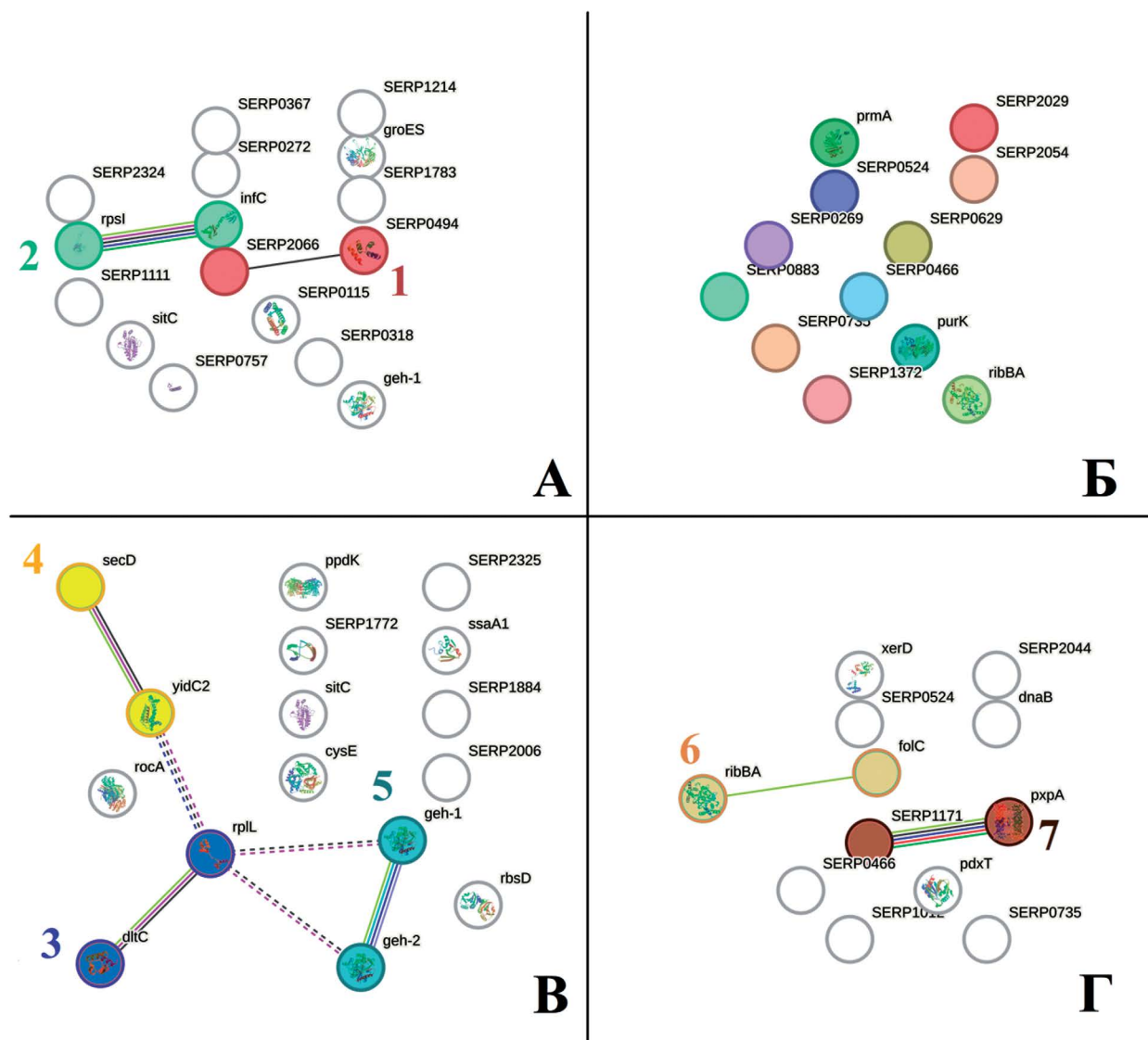


Рис. 1. Изменения белковых профилей планктонных культур в зависимости от времени культивирования. А, Б – контрольные образцы без добавления гормона CNP; В, Г – образцы с добавлением гормона CNP. А, В – белки в пониженном количестве в 72-ч планктонных культурах по сравнению с 24-ч культурами; Б, Г – белки в повышенном количестве в 72-ч планктонных культурах по сравнению с 24-ч культурами. 1 – кластер предполагаемых Zn-зависимых дегидрогеназ и PhnB-подобных белков; 2 – кластер синтеза белков: рибосомального белка S9 и фактора инициации трансляции IF-3; 3 – кластер переносчика D-аланила и рибосомного белка L7/L12; 4 – кластер экскреции белков и, возможно, кворум-сенсинга; 5 – кластер метаболизма липидов (триглицеридов); 6 – кластер белков биосинтеза фолата; 7 – кластер циклофилиноподобных белков семейства MRA-NP.

3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазы/ГТФ-циклогидролазы II и гуанозин-монофосфатредуктазы (обозначен цифрой 2 на рис. 2Б). Таким образом, потенциально в биопленках *S. epidermidis* без добавления гормона CNP с увеличением времени культивирования также изменяется процесс экскреции белков и метаболизм гуанозин-содержащих фосфатов.

В присутствии CNP, в отличие от планктонных культур, число изменившихся в количестве белков

в биопленках *S. epidermidis* было существенно меньше – всего 19, из которых 4 – в увеличенном количестве в 72-ч биопленках. При этом 8 белков совпадали с таковыми в планктонных культурах, выращенных в присутствии CNP (табл. S2). Интересно, что в биопленках все совпавшие с “планктонными” белки были в пониженном количестве, тогда как в планктонных культурах белок, содержащий домен DUF262, был в увеличенном количестве после 72 ч инкубации. Все эти факты также

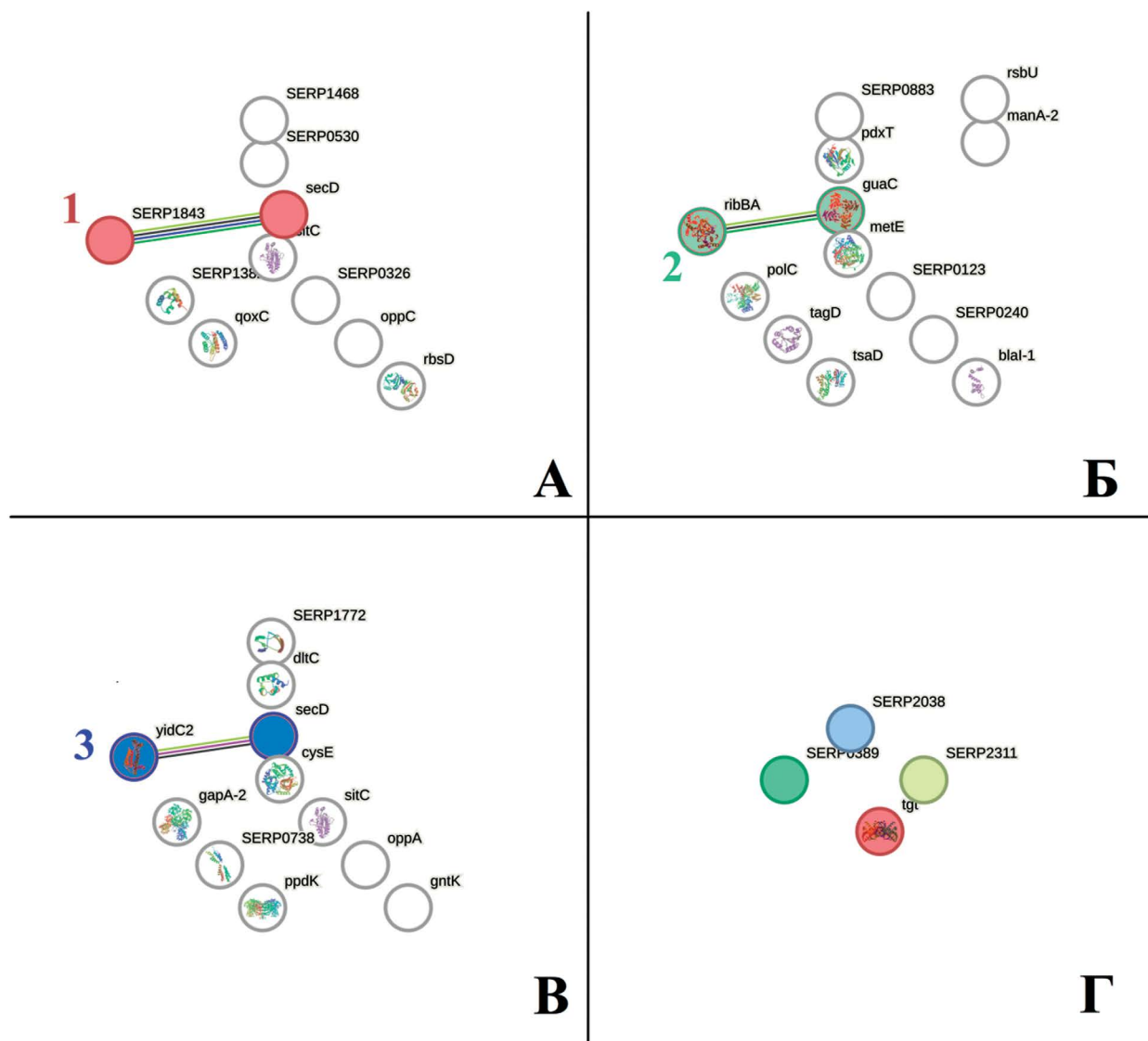


Рис. 2. Изменения белковых профилей биопленок *S. epidermidis* в зависимости от времени культивирования. А, Б – контрольные образцы без добавления гормона CNP; В, Г – образцы с добавлением гормона CNP. А, В – белки в пониженном количестве в 72-ч биопленках по сравнению с 24-ч биопленками; Б, Г – белки в повышенном количестве в 72-ч биопленках по сравнению с 24-ч. 1 – кластер экскреции белков; 2 – кластер 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазы/ГТФ-циклогидролазы II и гуанозин-монофосфатредуктазы; 3 – кластер экскреции белков.

показывают глобальный эффект гормона CNP на рост *S. epidermidis*. По аналогии с планктонными культурами, среди пониженных в количестве белков обнаружен кластер экскреции белков (обозначен цифрой 3 на рис. 2В), что позволяет отнести этот процесс к универсальным мишеням CNP у *S. epidermidis*, независимо от фенотипа. Однако при этом не наблюдали накопления лизостафина в 72-ч биопленках в отличие от планктонных культур. Среди белков в повышенных количествах не обнаружено связей, объединяющих их в кластеры (рис. 2Г). В целом изменялось количество

самых различных белков, в основном различных ферментов и транспортных белков.

Сравнение белковых профилей планктонных культур и биопленок. После определения изменений белковых профилей в планктонных культурах и биопленках, связанных со временем культивирования, исследовали различия между планктонными культурами и биопленками. Вначале изучили 24-ч образцы (рис. 3).

Сравнение контрольных образцов биопленок с планктонными культурами показало различие в относительном количестве 38 белков, из которых

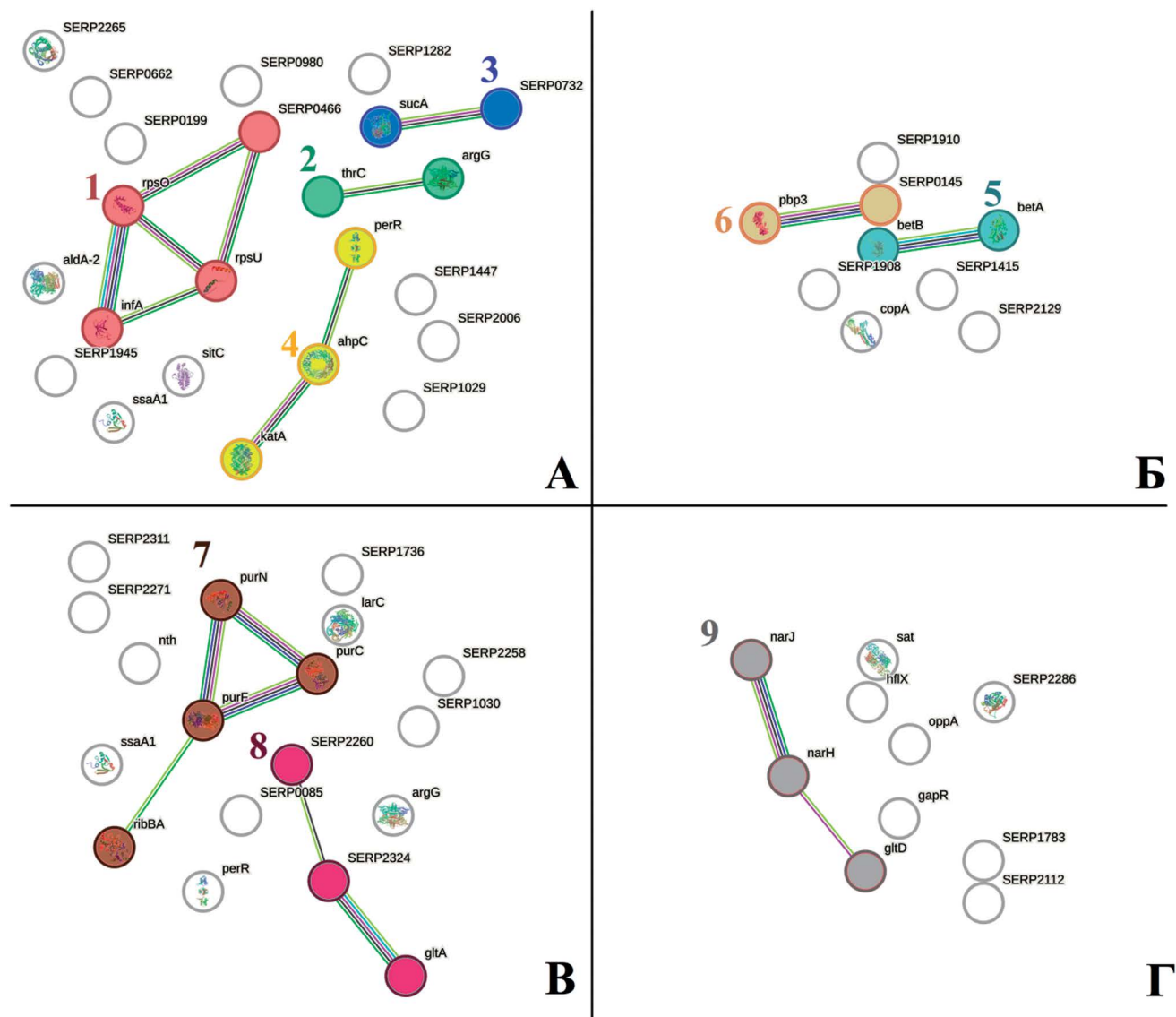


Рис. 3. Изменения белкового состава биопленок *S. epidermidis* по сравнению с планктонными культурами после 24 ч культивирования. А, Б – контрольные образцы; В, Г – образцы в присутствии CNP. А, В – белки в уменьшенном количестве в биопленках по сравнению с планктонными культурами; Б, Г – белки в увеличенном количестве в биопленках по сравнению с планктонными культурами. 1 – кластер синтеза белков и рибосом; 2 – кластер синтеза треонина и аргинина; 3 – кластер белков ЦТК; 4 – кластер белков антиоксидантной защиты; 5 – кластер метаболизма треонина, серина и глицина; 6 – белки клеточной стенки и деления; 7 – кластер белков синтеза пуринов и вторичных метаболитов; 8 – кластер белков ЦТК; 9 – кластер белков метаболизма нитрата.

28 были в уменьшенном количестве, 10 – в увеличенном (табл. S3), что в целом характеризует как минимум частичное замедление метаболизма в биопленках, подтверждая, таким образом, общие характеристики беспленочного фенотипа. Интересно, что транспортный белок Q5HRA3, понижавшийся в 72-ч планктонных культурах по сравнению с 24-ч, понижался и в 24-ч биопленках. Это может свидетельствовать о схожести старых планктонных культур с биопленками в том, что, вероятно,

при старении культур в них происходят некоторые сходные с “био пленочными” процессы. При этом если белка холодового шока CspA в 72-ч планктонных культурах становилось больше, то в 24-ч биопленках по сравнению с 24-ч планктонными культурами его, напротив, было меньше. В целом, в рамках данных периодов культивирования нельзя сказать, что 72-ч планктонные культуры сильно приближались по фенотипическим свойствам к биопленкам. Так, в биопленках явно замедлялись процессы

синтеза белков (кластер 1 на рис. 3А), синтез некоторых аминокислот (треонина и аргинина, кластер 2 на рис. 3А), работа цикла трикарбоновых кислот (кластер 3 на рис. 3А), а также понижалось количество белков антиоксидантной защиты (кластер 4 на рис. 3А). При этом увеличивалось количество белков метаболизма треонина, серина и глицина (кластер 5 на рис. 3Б), и, по-видимому, изменялись процессы синтеза и устойчивость клеточных стенок, что выражалось в увеличении белка деления DivIC и пенициллин-связывающего белка Phb3, который в том числе участвует в синтезе пептидогликана (кластер 6 на рис. 3Б). Кроме того, поскольку этого белка становится больше в клетках биопленок *S. epidermidis*, вероятно, биопленки 24-часовые стафилококка становятся более устойчивыми к действию пенициллинов по сравнению с планктонными культурами. Таким образом, увеличение количества этого белка может быть одним из конкретных механизмов устойчивости биопленок *S. epidermidis* к β -лактамам.

Далее мы проанализировали влияние CNP на различия между планктонными культурами и биопленками после 24 ч культивирования (дополнительные материалы, табл. S4). В отличие от контрольных образцов, изменения затронули 28 белков, из которых 18 были в меньшем количестве в биопленках, а 10 — в большем. Интересно, что набор измененных белков совершенно не содержит повторяющихся с обнаруженными в контрольных образцах. При этом среди белков в уменьшенном количестве был обнаружен кластер белков синтеза пуринов и вторичных метаболитов (кластер 7 на рис. 3В), а также кластер белков ЦТК (кластер 8 на рис. 3В), однако последний содержит три других белка, отличных от таковых в контрольных образцах. Среди белков в увеличенном количестве был обнаружен кластер белков метаболизма нитрата, в том числе дыхательная нитрогеназа (кластер 9 на рис. 3Г). Это может свидетельствовать о повышенной интенсивности анаэробного дыхания в биопленках в присутствии CNP по сравнению с планктонными культурами.

Сравнение 72-ч биопленок относительно планктонных культур показало значительные изменения в метаболизме *S. epidermidis*, произошедшие в течение длительного культивирования. При определении изменений в контрольных образцах было выявлено, что число белков в измененном количестве в биопленках относительно планктонных культур всего 18, из которых 4 — в увеличенном количестве (дополнительные материалы, табл. S3). Большинство из измененных белков приходилось на различные ферменты и транспортные белки, а также среди сниженных белков обнаружен фрагмент фактора элонгации Ef-Tu. При этом совпадений с 24-ч образцами обнаружено не было. Среди белков в сниженном количестве был обнаружен

кластер 2-оксоизовалератдегидрогеназы E3 и глутаматдегидрогеназы (кластер 1 на рис. 4А).

Белки в повышенном количестве не формировали кластеры, среди них, вероятно, стоит отметить цинк-зависимую алкогольдегидрогеназу и ди-ацетилредуктазу, формирующую ацетонин.

В присутствии CNP метаболизм 72-ч биопленок и планктонных культур кардинально менялся. Во-первых, число измененных белков составило 50, из которых 41 — в пониженном количестве (дополнительные материалы, табл. S4). Во-вторых, только один белок, а именно E5FXR0 фрагмент фактора элонгации Ef-Tu, повторялся в наборе измененных белков в образцах с CNP и в контрольных, что говорит, в целом, о потенциально замедленной трансляции в биопленках независимо от присутствия гормона. При этом CNP в среде приводил к появлению большого количества различий в белковых профилях (рис. 4В, 4Г). Так, среди белков в сниженном количестве был обнаружен кластер 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазы/ГТФ-циклогидролазы II и гуанозин-монофосфатредуктазы (кластер 2 на рис. 4В), который был в повышенном количестве в 72-ч планктонных культурах относительно 24-ч в присутствии CNP. Таким образом, эти белки каким-то образом реагируют на присутствие гормона в среде. Затем были понижены кластер белков кворум-сенсинга на основе фенол-растворимых модулинов (кластер 3 на рис. 4В) синтеза пуринов через фолат (кластер 4 на рис. 4В), белки синтеза тиамина (кластер 5 на рис. 4В) и метаболизма глицеролипидов (кластер 6 на рис. 4В). Большой кластер из 9 белков ЦТК и метаболизма углерода (кластер 7 на рис. 4В) был в сниженном количестве, что в совокупности с предыдущими кластерами позволяет предполагать значительное замедление метаболизма биопленок стафилококка относительно планктонных культур в присутствии CNP. При этом среди белков в повышенном количестве в биопленках обнаружен кластер из 4 белков метаболизма нитрата, в т.ч. дыхательной нитрогеназы (кластер 8 на рис. 4Г), что позволяет предположить интенсификацию анаэробного дыхания. Гипотетически (нуждается в экспериментальном подтверждении), это может означать переключение с брожения на дыхание, однако каким образом это может быть сопряжено с замедлением ЦТК, остается неясным. Наконец, важно отметить также сильное снижение количества лизостафина в биопленках по сравнению с планктонными культурами в присутствии гормона. Учитывая, что в планктонных клетках количество лизостафина в присутствии CNP увеличивалось при длительном культивировании, вероятно, CNP каким-то образом регулирует антибактериальную активность *S. epidermidis*, увеличивая ее именно в планктонных клетках, но не в биопленках при

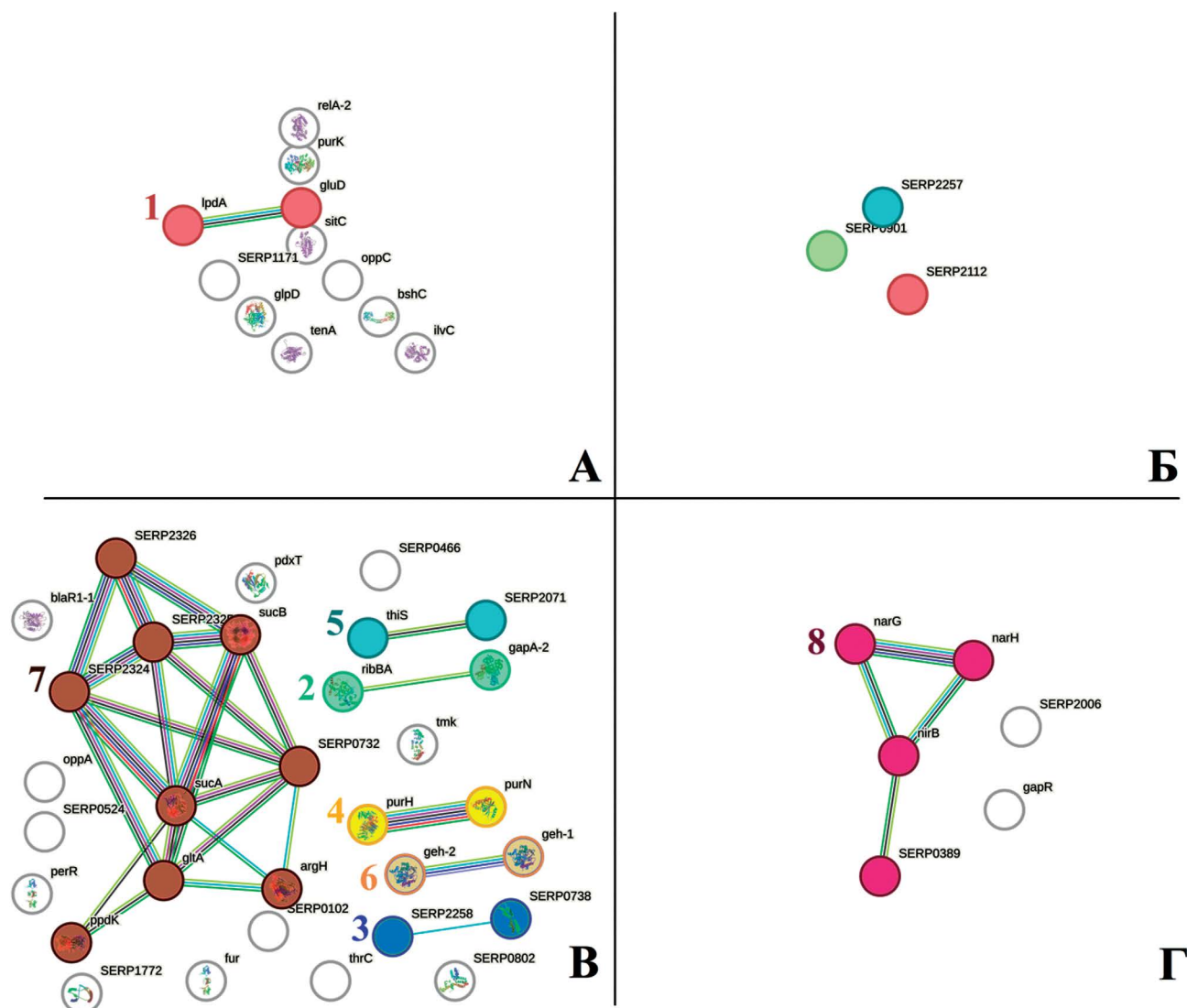


Рис. 4. Изменения белкового состава биопленок *S. epidermidis* по сравнению с планктонными культурами после 72 ч культивирования. А, Б – контрольные образцы; В, Г – образцы в присутствии CNP. А, В – белки в уменьшенном количестве в биопленках по сравнению с планктонными культурами; Б, Г – белки в увеличенном количестве в биопленках по сравнению с планктонными культурами. 1 – кластер 2-оксоизовалератдегидрогеназы Е3 и глутаматдегидрогеназы; 2 – кластер 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазы/ГТФ-циклогидролазы II и гуанозинмонофосфатредуктазы; 3 – кластер белков кворум-сенсинга на основе фенол-растворимых модулинов; 4 – синтез пуринов через фолат; 5 – кластер белков синтеза тиамина; 6 – кластер метаболизма глицеролипидов; 7 – кластер белков ЦТК; 8 – кластер белков метаболизма нитрата.

длительной инкубации. Возможно также, что снижение количества лизостафина в биопленках стафилококка является одной из причин увеличения доли *S. acnes* в сообществе, показанного ранее (Ovcharova et al., 2023).

Подводя итог этой части работы, можно смело утверждать, что гормон CNP в значительной степени влияет на метаболизм *S. epidermidis*, как в планктонном, так и в биопленочном состоянии. При этом, учитывая, что набор белков, количество которых изменяется в клетках, значительно

разнится в зависимости от типа образцов и групп сравнения, а также учитывая, что экспрессия всего двух генов меняется в биопленках (Ovcharova et al., 2023) в присутствии CNP, эффект гормона является мультитаргетным и, скорее всего, проявляется на посттрансляционном уровне.

Исследование влияния гормона CNP на планктонные культуры и биопленки *S. epidermidis*: изменения белковых профилей в присутствии гормона. Чтобы выяснить, какие изменения происходят в планктонных клетках и биопленках *S. epidermidis*

Таблица 2. Белки, меняющие свою концентрацию при воздействии CNP в планктонных культурах *S. epidermidis*; ↑ — увеличение, ↓ — уменьшение концентрации

ID	Название	Кратность изменения, разы	MS/MS счет	Значение Q	Молекулярный вес, кДа
24 ч культивирования					
Q5HPP9	Белок, содержащий тиамин-связывающий домен	0.07↓	180	0	10.876
Q5HR66	Белок, содержащий домен DUF402	24.15↑	11	0.000771	23.697
72 ч культивирования					
A0A829LY46	Пиримидиннуклеозид-фосфорилаза	0.02↓	1	0	46.226
Q5HRT4	Малая субъединица глутаматсинтазы	0.11↓	20	0	54.709
Q5HQD8	Белок, содержащий домен DUF2187	0.12↓	39	0	7.0089
A0A8I0WAQ6	Компонент E1 α-субъединицы пируватдегидрогеназы	9.19↑	45	0	41.514
A0A829LRQ6	Неохарактеризованный белок	12.02↑	16	0.005682	88.742
Q5HDW7	Белок uS17 малой субъединицы рибосом	36.04↑	5	0	10.175

в присутствии гормона CNP, а также, чтобы соотнести результаты проверки экспрессии генов, полученные ранее (Ovcharova et al., 2023), провели сравнение белковых профилей контрольных образцов и образцов с CNP планктонных культур и биопленок. В планктонных культурах после 24 ч культивирования изменялось количество двух белков (табл. 2), при этом эти белки не соответствовали генам, экспрессия которых снижается в присутствии CNP, как было показано ранее (Ovcharova et al., 2023).

Один из белков способен связывать тиамин, его количество снижалось в присутствии гормона, что отчасти согласуется с данными, полученными при сравнении 72-ч биопленок с планктонными культурами в присутствии CNP. По-видимому, биосинтез тиамина каким-то образом регулируется CNP у *S. epidermidis*. Функция второго белка неизвестна, однако его количество повышалось в присутствии гормона более чем в 20 раз. В 72-ч планктонных культурах происходило больше изменений под действием гормона: три белка уменьшались в количестве, а три — повышались, при этом все они обладают разными функциями, и затруднительно определить причину данного изменения. Это является следствием мультитаргетного воздействия CNP на клетки и также, по-видимому, результатом процессов второго и более порядка относительно добавления CNP (изменения, непосредственно спровоцированные гормоном, вероятно, могли вызывать каскады реакций в клетках, что приводило к изменению концентрации различных белков).

Суточные биопленки были более восприимчивы к действию гормона, чем планктонные культуры. В совокупности с описанными выше данными

это позволяет предположить, что CNP действует преимущественно на биопленки, что подтверждается ранее полученными данными (Ovcharova et al., 2023). Как и в случае с планктонными культурами, белки различных функций были затронуты гормоном, однако пять белков были схожи с таковыми, которые изменялись в 72-ч биопленках по сравнению с планктонными культурами в присутствии CNP (табл. 3).

Примечательно, что белки D4FK92 и D2JC70 были в увеличенном количестве под действием CNP в 24-ч биопленках по сравнению с контрольными биопленками, тогда как при сравнении планктонных культур и биопленок после 72 ч культивирования количество этих белков в биопленках было меньше. Вероятно, эти белки могут быть каким-то образом задействованы в ответе клеток *S. epidermidis* на присутствие гормона. При сравнении 72-ч биопленок в присутствии CNP с 72-ч биопленками без гормона только один белок был в измененном (уменьшенном) количестве — пируватфосфатдикиназа PpdK. Он входит в состав кластера белков ЦТК. Вероятно, данный белок является ключевым белком, который может быть косвенно или напрямую связан с акцептированием CNP в клетках *S. epidermidis*.

Говоря в целом о влиянии гормона CNP на *S. epidermidis*, можно утверждать, что эффект CNP на планктонные культуры и биопленки *S. epidermidis* в анаэробных условиях сложен и неоднозначен. Обобщающая схема эффектов приведена на рис. 5.

Однозначно трудно определить, что конкретно является мишенью действия гормона, поскольку изменения, вызываемые CNP, носят, судя по всему, глобальный характер, учитывая большие

Таблица 3. Белки, меняющие свою концентрацию в биопленках *S. epidermidis* под воздействием CNP; ↑ – увеличение, ↓ – уменьшение концентрации; ↑↓ – белки, которые обнаружены при сравнении 72-ч планктонных культур и биопленок в присутствии CNP

ID	Название	Кратность изменения, разы	MS/MS счет	Значение Q	Молекулярный вес, кДа
24 ч культивирования					
Q5HGH6	Белок uS2 малой субъединицы рибосом	0.11↓	53	0	29.395
D4FL23	Белок, содержащий домен DUF4064	0.14↓	7	0	22.143
A0A4Y7VUY2↑↑	Альдегидалькоголь-дегидрогеназа	0.16↓	1855	0	95.659
A0A8I0WBA0↑↑	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	0.16↓	142	0	36.148
D2JC70↑↑	Белок, содержащий домен DUF262	5.32↑	12	0.002874	73.392
D4FK92↑↑	Пептид субстрат-связывающего белка ABC-транспортера 5	11.37↑	21	0	61.386
A0A8I0WB17	Триптофан-тРНК-лигаза	12.77↑	28	0	37.278
A0A8I1BDW7	Минирибонуклеаза 3	15.86↑	5	0	14.88
A0A829LRQ6	Неохарактеризованный белок	50.85↑	16	0.005682	88.742
72 ч культивирования					
D4FKZ3↑↑	Пируватфосфатдикиназа	0.09↓	435	0	98.1

различия в составе белков, которые изменяются при переходе от планктонного образа существования к биопленочному. При этом непосредственно сам по себе CNP меняет относительно небольшое число белков, если сравнивать обработанные образцы с необработанными (планктонные культуры с планктонными культурами и биопленки с биопленками). Кроме того, эффект гормона зависит от времени инкубации. Однако, несмотря на общую сложность ответа *S. epidermidis* на присутствие гормона в среде, можно обозначить одну важную закономерность: в присутствии гормона ярче проявлялась разница между планктонными культурами и биопленками. Это выражалось как в большем количестве белков, изменявшихся при переключении фенотипа с планктонного на биопленочный, так и в большем количестве функциональных кластеров белков. Необходимо отметить, несмотря на относительно небольшое количество белков, которые изменяются при действии CNP в планктонных культурах и биопленках, более обширные изменения при фенотипическом переходе дают дополнительное подтверждение направленности действия CNP именно на биопленки и их формирование. Это коррелирует с результатами предыдущей работы (Ovcharova et al., 2023), в которой показано отсутствие эффекта CNP на оптическую плотность планктонной культуры стафилококка и одновременное подавление роста биопленок. Поскольку в присутствии CNP в биопленках *S. epidermidis* потенциально как минимум отчасти замедляется

работа ЦТК, синтеза пуринов и других процессов, по-видимому, CNP не оказывает подавляющего эффекта на рост планктонной биомассы и уже сформированных биопленок (в пользу последнего говорит достаточно небольшое количество измененных белков), но замедляет формирование биопленок из планктонной культуры. На основании сравнения планктонных культур и биопленок в присутствии CNP можно также предположить, что, вероятно, при воздействии гормона на *S. epidermidis* в формирующихся в присутствии CNP биопленках происходит некое переключение катаболических процессов в сторону нитратного дыхания. Также весьма интересно, что при длительном культивировании планктонных культур в клетках *S. epidermidis* накапливается лизостафин. Связано ли это с нарушением экспорта пептидов или по другой причине, — предстоит изучать в будущем, однако в биопленках при этом в присутствии CNP лизостафина гораздо меньше, чем в планктонных клетках. Может ли это каким-либо образом быть связано с уменьшением конкурентных свойств эпидермального стафилококка, показанного ранее в отношении *S. acnes*, нужно исследовать отдельно, поскольку более между образцами подобной разницы обнаружено не было. Тем не менее, возможно, при росте биопленок из планктонных культур в присутствии гормона это может быть одним из механизмов понижения конкурентных свойств *S. epidermidis*, вызываемых NP. Наконец, поскольку в большинстве случаев в присутствии гормона так или иначе изменяются белки, связанные с ЦТК,

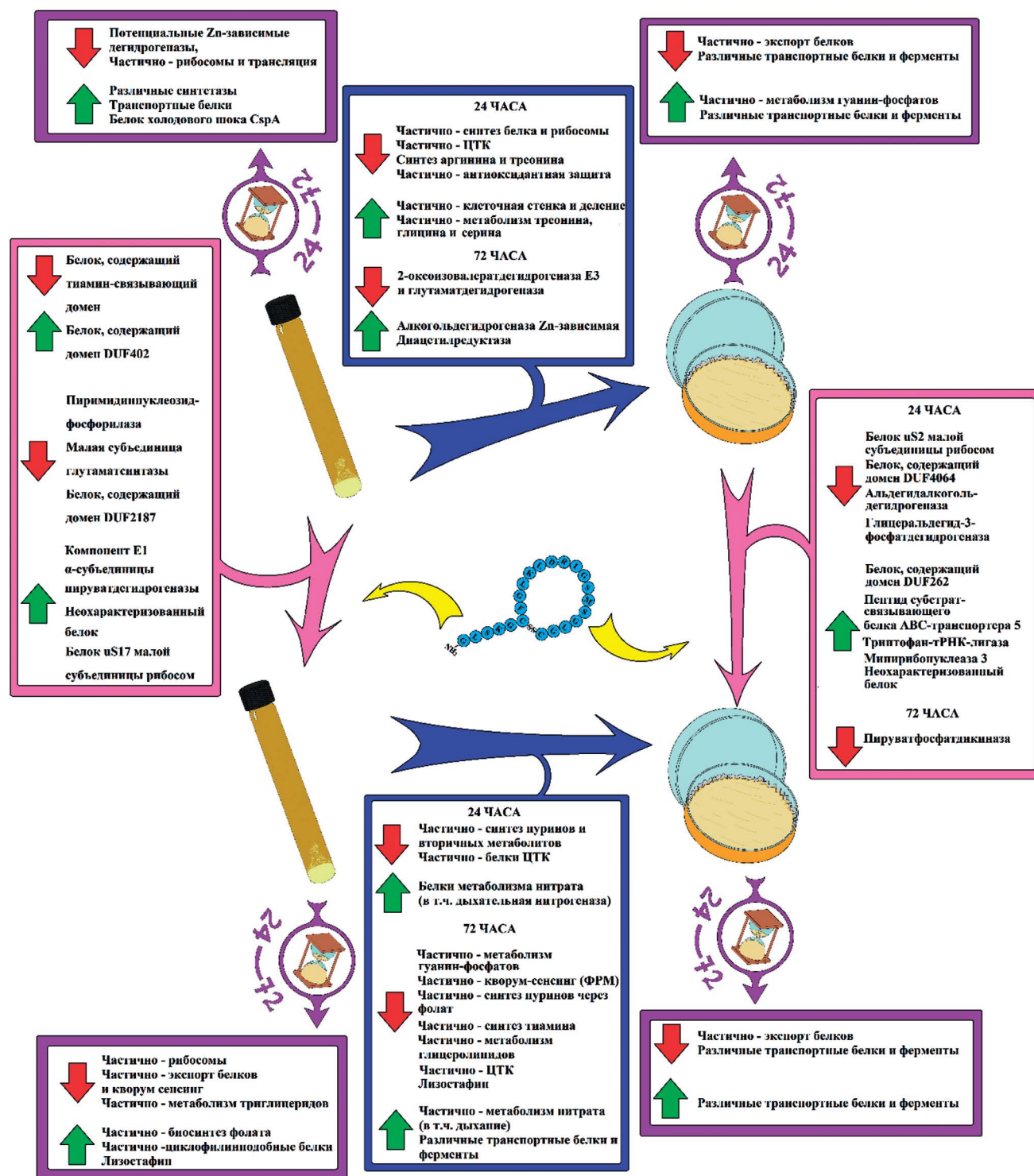


Рис. 5. Обобщающая схема, иллюстрирующая эффекты CNP на белковый состав планктонных культур и биопленок *S. epidermidis*, а также различия в белковых профилях между планктонными культурами и биопленками стафилококка.

вероятно, этот процесс является одной из мишеней действия гормона наряду с транспортом и синтезом белков и аминокислот.

Подводя итог, стоит отметить, что вопрос механизма действия CNP на *S. epidermidis* остается неясным и требует дальнейшего изучения.

Большое количество измененных белков и, что важно, отсутствие корреляции между экспрессией генов (Ovcharova et al., 2023) и измененными белками как минимум в исследованной временной точке говорит, во-первых, о потенциально мультитаргетном действии гормона. Во-вторых, это свидетельствует об эффекте CNP, по всей видимости, на транскрипционном, трансляционном и, вероятно, даже посттрансляционном уровнях. По крайней мере одним из механизмов действия CNP на *S. epidermidis* может являться взаимодействие гормона с N-ацетомурамоил-L-аланинамидазой — белком, на 38.74% сходным по структуре с амидазой *AmiC P. aeruginosa* (согласно анализу, проведенному с помощью NCBI Protein BLAST). Ранее было предсказано, что *AmiC* псевдомонад структурно сходна с рецептором натрийуретического пептида NRP-C (Rosay et al., 2015), а также показано взаимодействие *AmiC* с остеокрином — агонистом рецепторов натрийуретических пептидов человека (Louis et al., 2023). Таким образом, обладая белком, сходным по структуре, *S. epidermidis* может воспринимать CNP подобно псевдомонадам, что тем не менее требует дальнейшего исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят коллектив лаборатории молекулярной экологии и филогеномики бактерий (зав. лаб. С.Н. Дедыш) и персонально С.Э. Белову, А.А. Иванову и И.Ю. Ошкина за любезное предоставление доступа к прибору FastPrep и помощь в разрушении биомассы клеток и биопленок.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-74-10071). Работа В.К. Плакунова выполнена частично за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ганнесен А.В., Лезуатье О., Нетрусов А.И., Плакунов В.К., Фейоле М.Ж. Регуляция натрийуретическими пептидами формирования моновидовых и бинарных биопленок бактерий микробиоты кожи *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus* // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 469–482.
- Gannesen A.V., Lesouhaitier O., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Feuilloy M.G. Regulation of formation of monospecies and binary biofilms by human skin microbiota components, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, by human natriuretic peptides // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 597–609.
- Дювенжи Е.В., Неволлина Е.Д., Мартыанов С.В., Журина М.В., Калмантаева О.В., Макарова М.А., Бочкова Е.А., Фирстова В.В., Плакунов В.К., Ганнесен А.В. Бинарные биопленки *Staphylococcus aureus* 209P и *Cytococcus schroeteri* H01: дуалистическая роль китоккокков и изменения клеточной адгезии в присутствии натрийуретического пептида а-типа // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 597–612.
- Diuvengi E.V., Nevolina E.D., Mart'yanov S.V., Zhurina M.V., Kalmantaeva O.V., Makarova M.A., Botchkova E.A., Firstova V.V., Plakunov V.K., Gannesen A.V. Binary biofilms of *Staphylococcus aureus* 209P and *Cytococcus schroeteri* H01: dualistic role of kytococci and cell adhesion alterations in the presence of the A-type natriuretic peptide // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 563–576.
- Benjamini Y., Krieger A.M., Yekutieli D. Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate // Biometrika. 2006. V. 93. P. 491–507.
- Gannesen A.V., Lesouhaitier O., Racine P.J., Barreau M., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Feuilloy M.G.J. Regulation of monospecies and mixed biofilms formation of skin *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* by human natriuretic peptides // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 2912.
- Gannesen A.V., Ziganshin R.H., Ovcharova M.A., Nevolina E.D., Klimko A.I., Mart'yanov S.V., Plakunov V.K. Epinephrine affects ribosomes, cell division, and catabolic processes in *Micrococcus luteus* skin strain C01: revelation of the conditionally extensive hormone effect using orbitrap mass spectrometry and proteomic analysis // Microorganisms. 2023. V. 11. Art. 2181.
- Ikeda K., Ikeda T., Onizuka T., Terashi H., Fukuda T. C-type natriuretic peptide concentrations in the plasma and cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage // Crit. Care. 2000. V. 5. P. 37–40.
- Kalaycı-Yüksek F., Gümüş D., Anđ-Küçük M. Hormones can influence antibiotic susceptibilities even in mono- and co-culture conditions // Acta Biologica Marisensis. 2021. V. 4. P. 39–49.
- Kalaycı-Yüksek F., Gümüş D., Güler V., Uyanık-Öcal A., Anđ-Küçük M. Progesterone and estradiol alter the growth, virulence and antibiotic susceptibilities

- of *Staphylococcus aureus* // New Microbiol. 2023. V. 46. P. 43–51.
- Kovalchuk S.I., Jensen O.N., Rogowska-Wrzesinska A. FlashPack: fast and simple preparation of ultra-high-performance capillary columns for LC-MS // Mol. Cell. Proteomics. 2019. V. 18. P. 383–390.
- Kulak N.A., Pichler G., Paron I., Nagaraj N., Mann M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells // Nat. Methods. 2014. V. 11. P. 319–324.
- Louis M., Tahrioui A., Tremlett C.J., Clamens T., Lepince J., Lefranc B., Kipnis E., Grandjean T., Bouffartigues E., Barreau M., Defontaine F., Cornelis P., Feuilloley M.G.J., Harmer N.J., Chevalier S., Lesouhaitier O. The natriuretic peptide receptor agonist osteocrin disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilm // Biofilm. 2023. V. 5. Art. 100131.
- Lumsden N.G., Khambata R.S., Hobbs A.J. C-type natriuretic peptide (CNP): cardiovascular roles and potential as a therapeutic target // Curr. Pharm. Des. 2010. V. 16. P. 4080–4088.
- Lugman A. The orchestra of human bacteriome by hormones // Microb. Pathog. 2023. P. 106125.
- Ovcharova M.A., Geraskina O.V., Danilova N.D., Botchkova E.A., Mart'yanov S.V., Feofanov A.V., Plakunov V.K., Gannesen A.V. Atrial natriuretic peptide affects skin commensal *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes* dual-species biofilms // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 552.
- Ovcharova M.A., Schelkunov M.I., Geras'kina O.V., Makarova N.E., Sukhacheva M.V., Mart'yanov S.V., Nevolina E.D., Zhurina M.V., Feofanov A.V., Botchkova E.A., Plakunov V.K., Gannesen A.V. C-type natriuretic peptide acts as a microorganism-activated regulator of the skin commensals *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes* in dual-species biofilms // Biology. 2023. V. 12. Art. 436.
- Potter L.R., Yoder A.R., Flora D.R., Antos L.K., Dickey D.M. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications // cGMP: Generators, effectors and therapeutic implications. Handbook of experimental pharmacology / Eds. Schmidt H.H.H.W., Hofmann F., Stasch J.P. V. 191. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. P. 341–366. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68964-5_15
- Rosay T., Bazire A., Diaz S., Clamens T., Blier A.S., Mijouin L., Hoffmann B., Sergent J.A., Bouffartigues E., Boireau W., Vieillard J., Hulen C., Dufour A., Harmer N.J., Feuilloley M.G.J., Lesouhaitier O. *Pseudomonas aeruginosa* expresses a functional human natriuretic peptide receptor ortholog: involvement in biofilm formation // MBio. 2015. V. 6. 4. Art. 10.1128/mbio.01033-15.
- Tyanova S., Temu T., Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics // Nat. Protoc. 2016a. V. 11. P. 2301–2319.
- Tyanova S., Temu T., Sinicyn P., Carlson A., Hein M.Y., Geiger T., Mann M., Cox J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data // Nat. Methods. 2016b. V. 13. P. 731–740.
- Veron W., Lesouhaitier O., Pennanec X., Rehel K., Leroux P., Orange N., Feuilloley M.G.J. Natriuretic peptides affect *Pseudomonas aeruginosa* and specifically modify lipopolysaccharide biosynthesis // FEBS J. 2007. V. 274. P. 5852–5864.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Changes in the Protein Profiles of Planktonic Cultures and Biofilms of *Staphylococcus epidermidis* under Anaerobic Conditions in the Presence of the Hormone CNP

A. V. Gannesen^{1, *}, R. H. Ziganshin², M. A. Ovcharova¹, A. M. Mosolova¹, N. A. Loginova¹, E. V. Diuvenji¹, E. D. Nevolina¹, S. V. Mart'yanov¹, V. K. Plakunov¹

¹FRC "Fundamentals of biotechnology" of RAS, Moscow, 119071, Russia

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry of RAS, Moscow, 117997, Russia

*e-mail: andrei.gannesen@gmail.com

Natriuretic peptides (NP) are able to affect biofilms of human commensal microorganisms, including representatives of the genus *Staphylococcus*, however, the literature lacks data on the molecular changes caused by these hormones at the posttranslational level. In this regard, the present work shows for the first time that C-type natriuretic peptide (CNP) induces large changes in protein profiles of *Staphylococcus aureus* cells and biofilms. The presence of the hormone leads to a more pronounced difference in protein profiles between planktonic cells and biofilms when compared to control pairs of samples. The main processes affected are TCA cycle, protein transport, purine synthesis (decrease in the amount of the

corresponding proteins in biofilms) and nitrate metabolism (increase in the amount of nitrogenases and other proteins in biofilms). It is necessary to mention separately the decreased amount of lysostaphin in biofilms compared to planktonic cultures when exposed to CNP. This may be one of the potential mechanisms of the recently shown reduction of competitive properties of *S. epidermidis* in the community with other microorganisms, which is induced by the presence of CNP in the medium. In addition, the results of the study strengthen the hypothesis that, as in the case of other human hormones, the action of CNP on *S. epidermidis*, is multitargeted. One of the likely mechanisms of the hormone's action may be the disruption of the transition from planktonic culture to biofilm, which can be assumed without suppressing cell growth, which needs further verification.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, hormones, natriuretic peptides, C-type natriuretic peptide, biofilms, microbial endocrinology, proteomics, orbitrap mass-spectrometry