

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ШТАММА *Levilactobacillus brevis* 47f
В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА¹© 2023 г. Е. У. Полуэктова¹, *, О. В. Аверина¹, А. С. Ковтун¹, В. Н. Даниленко¹¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: epolu@vigg.ru

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 10.03.2023 г.

Принята к публикации 15.03.2023 г.

Levilactobacillus brevis 47f — гетероферментативная аэротолерантная молочнокислая бактерия, выделенная из микробиоты желудочно-кишечного тракта здорового человека. В комплексе доклинических исследований штамм проявил противовоспалительные свойства в отношении мукозита слизистой оболочки тонкого и толстого кишечника, индуцированного 5-фторурацилом. Вместе с тем молекулярные механизмы, определяющие свойства штамма и, в частности, его реакцию на воздействие активных форм кислорода, остаются неизученными. Задачей данной работы было исследовать реакцию штамма на действие окислителей — перекиси водорода и кислорода — методом транскрипционного RNAseq-анализа. Оба окислителя оказали сильное действие на штамм, увеличивая или снижая экспрессию нескольких сот генов — как общих, так и специфических для каждого оксиданта. Приведена характеристика белков с наиболее увеличенной экспрессией ($D\geq 5$). Гены, активизирующиеся при действии обоих оксидантов, кодируют белки стресса, антиоксидантной защиты, репарации белков и нуклеотидов, клеточной стенки, транспорта и метаболизма углеводов, катаболических путей запасающей энергии. При действии перекиси активизируется транскрипция в основном белков защиты: стрессового ответа и молекулярных шаперонов, антиоксидантной активности, репарации ДНК, а также белков, участвующих в формировании клеточной стенки. В аэробных условиях в значительной степени активизируются гены, определяющие белки преобразования энергии (использование в качестве источника энергии, помимо глюкозы, фруктозы, жирных кислот, нуклеозидов; белки фосфокетолазного пути) и импорта пептидов, аминокислот, сахаров. Полученные в настоящей работе результаты будут использованы нами при интегрированном анализе совокупности транскриптомных, протеомных и метаболомных данных по данному штамму. Это внесет значительный вклад в создание на основе *L. brevis* 47f фармабиотика для лечения различных воспалительных заболеваний.

Ключевые слова: транскриптомный анализ, *Levilactobacillus brevis*, перекись водорода, аэробный рост.

DOI: 10.31857/S0016675823080106, **EDN:** XTXIFD

Levilactobacillus brevis — грамположительная облигатно гетероферментативная молочнокислая бактерия, присутствующая в микробиоте человека (ротовой и вагинальной полостях и кишечнике) [1]. Среди представителей данного вида обнаружены и охарактеризованы штаммы, обладающие противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиоксидантными (АО) свойствами [2–4].

Одним из важных свойств лактобацилл, отбираемых для последующего применения в медицинской практике (фармабиотиков) и в качестве ингредиентов в функциональных продуктах питания, является устойчивость к действию оксидантов

и активных форм кислорода (АФК) и способность к повышению АО статуса организма хозяина [5, 6]. АФК образуются в результате неполного восстановления молекулярного кислорода до супероксидного радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$), перекиси водорода (H_2O_2) или гидроксильного радикала ($\text{OH}^{\cdot}$). С АФК бактерии взаимодействуют как внутри клетки, так и вне ее и поддерживают окислительно-восстановительный гомеостаз [7]. *L. brevis*, как и многие лактобациллы, обычно обитает в анаэробных условиях и получает энергию за счет реакций брожения, однако является аэротолерантной бактерией и способна расти в присутствии кислорода [8, 9]. Аэробный рост меняет метаболизм клетки, прежде всего метаболизм углеводов [10].

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823080106 для авторизованных пользователей.

Штамм *L. brevis* 47f синтезирует гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) — основной тормозной медиатор центральной нервной системы млекопитающих [11]. Бесклеточный супернатант штамма снижает АО активность параквата и перекиси водорода в люминесцентной тест-системе на основе рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* [12]. В комплексе доклинических исследований штамм проявил противовоспалительные свойства в отношении мукозита слизистой оболочки тонкого и толстого кишечника, индуцированного 5-фторурацилом [13]. Штамм *L. brevis* 47f можно рассматривать как потенциальный пробиотик поддерживающей терапии для пациентов, проходящих противоопухолевую химиотерапию. Оральное введение штамма крысам, находящимся в условиях постоянного освещения или постоянной темноты, нормализовало физиологические параметры животных и состав кишечной микробиоты [14]. Эти данные свидетельствуют о том, что штамм обладает рядом важных и разноплановых пробиотических свойств. Однако молекулярные механизмы, определяющие свойства штамма и, в частности, его реакцию на воздействие активных форм кислорода, которые образуются в ходе промышленных процессов, во время прохождения клеток по желудочно-кишечному тракту в нормальных условиях и при воспалительных процессах, остаются неизученными. Целью настоящей работы было исследовать реакцию штамма на действие окислителей — перекиси водорода и кислорода — методом транскрипционного RNAseq-анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальный штамм и условия роста

Штамм *Levilactobacillus brevis* 47f выделен из организма человека в РФ в 2010 г., депонирован в ВКПМ (№ B-12237), геном штамма секвенирован (GenBank LBHR01). Штамм выращивали на среде MRS (HiMedia, Индия) [15] при 37°C в частично анаэробных условиях (в эксикаторе, где кислород был выжжен горением свечи). Для транскриптомного анализа в условиях окислительного стресса бактериальную культуру выращивали до экспоненциальной фазы роста ($OD_{600} = 0.3$, контроль); далее добавляли H_2O_2 до 5 мМ и инкубировали 2 ч в тех же условиях (проба H_2O_2) и 4 ч в условиях аэрации (250 об./мин, 37°C) (проба O_2).

Выделение мРНК и секвенирование

Лизис и разрушение клеток проводили с помощью лизоцима, тритона X-100 и механически на приборе SpeedMill plus (Analytik Jena AG, Германия). РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Образцы РНК обрабатывали ДНКазой I для разрушения остатков ДНК.

Чистота образцов РНК тестировалась на спектрофотометре NanoDrop TM1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Для удаления рРНК образцы обрабатывали набором Ribo-off rRNA Depletion Kit (Bacteria) (Nanjing Vazyme Biotech Co, Китай). Библиотеки для секвенирования были получены с помощью набора MGIEasy RNA Directional Library Prep Set (MGI, Китай). Библиотеки оценивали проверкой распределения размера фрагментов с помощью Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent, США) и количественной характеристикой с помощью qPCR с зондом TaqMan (Евроген, Россия). Парноконцевое секвенирование фрагментов проводили на платформе DNBseq (BGI, Китай). Секвенированный транскриптом анализировали на наличие ошибок с использованием FastQCv0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Адаптеры обрезали с помощью программы Trimmomatic 0.39 [16].

Обработка и анализ транскриптомных данных

Проверенные на качество транскриптомные чтения секвенированных образцов были картированы на исследуемый геном (RefSeq GCF_001010995.1 *Levilactobacillus brevis* 47f) с использованием hisat2 v2.2.1 [17]. Картирования были отфильтрованы с помощью программного пакета SAMtools v1.10 [18]. Количество чтений на транскрипт оценивалось с помощью HTSeq-count v2.0.2 [19]. Дифференциальную экспрессию определяли как отношение количества картированных на ген чтений для опытной и контрольной проб. Анализ функциональной активности белков проводили по базам данных Clusters of Orthologous Groups (COG) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>), UniProt (<https://www.uniprot.org/>) и InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

*Чувствительность клеток штамма *L. brevis* 47f к действию оксидантов*

При использованных концентрациях и времени обработки жизнеспособность штамма менялась крайне незначительно (H_2O_2) или вообще не менялась (O_2) (рис. 1).

Оба оксиданта оказали сильное действие на экспрессию генов. Максимальные значения дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) — 44 для H_2O_2 и 30 для O_2 , минимальные — 0.02 для H_2O_2 и 0.03 для O_2 . Число ДЭГ приведено на рис. 2, а, б. Наиболее сильное изменение ДЭГ вызывает H_2O_2 . ДЭГ H_2O_2 и O_2 частично перекрываются, хотя в целом значительно различаются друг от друга.

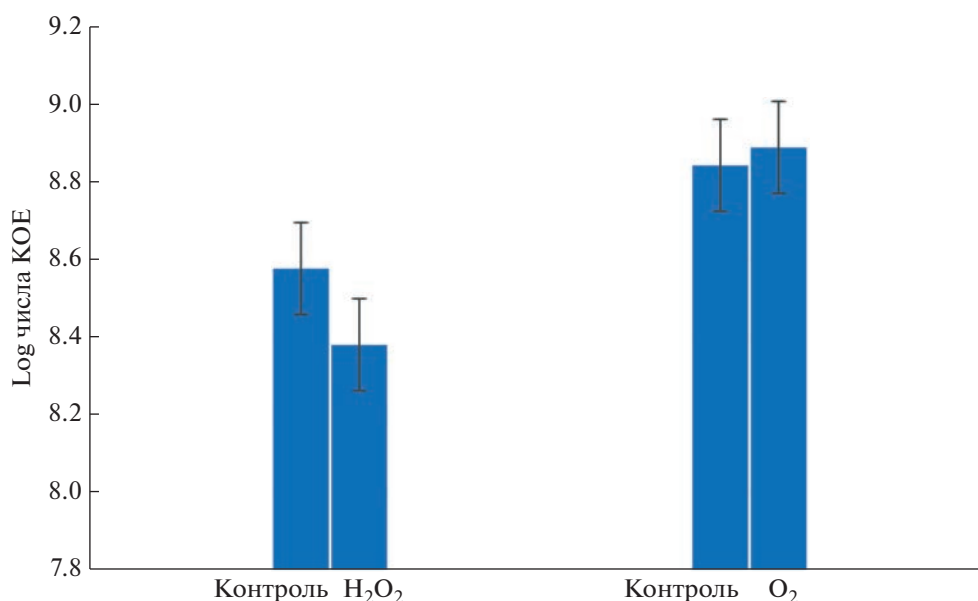


Рис. 1. Чувствительность клеток штамма *L. brevis* 47f к действию оксидантов.

Гены белков-антиоксидантов штамма *L. brevis* 47f

Ранее мы составили каталог генов/белков с АО функцией у лактобацилл и бифидобактерий [20]. В табл. 1 на основе этого каталога приведены гены белков-антиоксидантов штамма *L. brevis* 47f и соответствующие им значения ДЭ. В геноме штамма отсутствуют гены глутаредоксина, синтеза и метаболизма глутатиона (глутатионредуктазы, глутатионсинтазы, глутатион-S-трансферазы), супероксиддисмутаза, поэтому они не приведены в табл. 1. ДЭГ меняется у 25 из 40 генов при действии H₂O₂ и только у 10 из 40 генов при действии O₂, причем восемь из этих десяти генов проявляют ДЭ и при действии H₂O₂. К генам, увеличивающим экспрессию под действием перекиси, относятся гены АТФаз-переносчиков ионов меди, белков Dps, NrdH, глутатионпероксидазы, олеатгидратазы, FAD- и NAD(P)H/FAD-зависимых оксидоредуктаз, пируватоксидазы, пероксидазы, тиоредоксина, тиоредоксинредуктазы, пероксидероксина. Снижение ДЭГ при действии перекиси отмечается всего у двух генов. При действии кислорода увеличивается экспрессия ДНК-связывающего белка Dps, олеатгидратазы, одного из двух генов тиоредоксина, пероксидероксина и ряда оксидоредуктаз. Снижение ДЭГ отмечается у двух генов.

Распределение белков, соответствующих ДЭГ ≥ 5, по функциональным категориям

Далее мы охарактеризовали белки, соответствующие генам с наиболее сильным увеличением экспрессии (ДЭ ≥ 5). Белки были разделены на

три группы: общие для обоих типов стресса, специфические для O₂, специфические для H₂O₂. На рис. 2, в представлено общее число таких генов, характеристики отдельных генов и белков приведены в табл. S1–S3. Из генов с измененной экспрессией около 60% увеличивают экспрессию при действии обоих оксидантов, около 40% являются специфическими для перекиси и кислорода. На рис. 3 представлено распределение специфических для перекиси водорода и кислорода белков с ДЭ ≥ 5 по функциональным категориям COG (Clusters of Orthologous Genes). Всего распределено 176 белков, из них 47 не имеют COG-категории, у семи функция неизвестна (в том числе и для белка, кодируемого геном AAX72_RS14285 и дающего максимальную ДЭ 44.28 для H₂O₂/12.96 для O₂), для 14 предсказана только общая функция. Таким образом, точная функция более чем трети белков (68 белков, 38.6%) неизвестна. Гены с ДЭ в случае действия перекиси и кислорода различались. При действии перекиси преобладали категории: посттрансляционная модификация/белковый обмен/шапероны; клеточная стенка/мембрана/биоге́нез клеточной оболочки; защитные механизмы; мобилон: профаги/транспозоны; репликация/рекомбинация/репарация; транспорт и метаболизм неорганических ионов; транскрипция. При действии кислорода преобладали категории: транспорт и метаболизм липидов, углеводов, аминокислот; выработка и преобразование энергии.

Характеристика отдельных генов/белков с ДЭ ≥ 5

Далее дана более подробная характеристика белков, соответствующих трем группам: общей

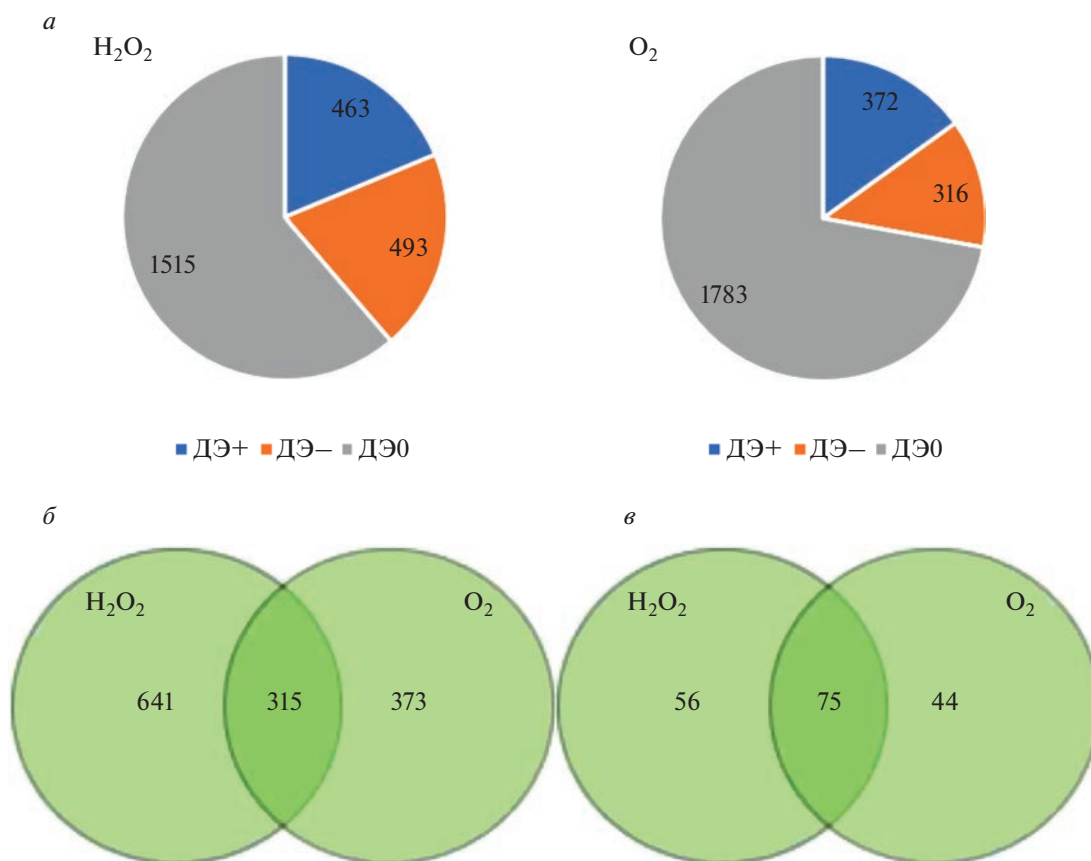


Рис. 2. Характеристика числа генов с ДЭ ≥ 2 (ДЭ+) и ДЭ ≤ 0.5 (ДЭ-) штамма *L. brevis* 47f при действии кислорода и перекиси водорода. а – соотношение общего числа генов; б – общие и специфические гены с наиболее сильным увеличением экспрессии (ДЭ ≥ 5).

для H₂O₂ и O₂ и двум специфическим. Деление достаточно условное; так, различные гены тиоредоксина, Dps белка, Fe-S кластера, альдо-кеторедуктаз могут входить не в одну, а в две группы. Условно и деление белков на функциональные группы. Один и тот же белок может участвовать в окислительно-восстановительных процессах, метаболизме углеводов (пируватоксидоза) и адгезии (выполнять дополнительную функцию, т.н. совместительство белков (protein moonlighting), например трансальдолаза).

O₂ и H₂O₂ общие гены/белки

Эта группа содержит 75 генов с ДЭ ≥ 5 , из них 70 кодируют белки, в том числе:

- стрессовые белки. Это оперон, объединяющий гены малых стрессовых белков, связанных с мембранами (AAX72_RS08655–AAX72_RS08675), гены универсальных стрессовых белков, белков семейств CsbD и GlsB/YeaQ/YmgE;

- белки АО защиты (олеатгидратаза, белок Dps, пероксидероксин, один из двух генов тиоредоксина, два из четырех имеющихся генов белков

железосерного кластера), а также восемь оксидоредуктаз. Это белки COG-категорий, которые определяют транспорт и метаболизм липидов FabG (AAX72_RS09445, AAX72_RS00795, AAX72_RS00795); FadH2 (AAX72_RS13105, AAX72_RS11615), а также продукцию и преобразование энергии Lpd (AAX72_RS04865, AAX72_RS12425);

- белки, осуществляющие репарацию белков и нуклеотидов (пептид-метионин S-оксидоредуктазы, MrsA и MrsB, NUDIX белок);

- белки компонентов клеточной стенки (синтеза липотейхоевой кислоты – диацилглицеролкиназа) и выведения из клетки токсических веществ (белок механочувствительного канала MscL, пермеаза AAX72_RS02830);

- шесть из десяти имеющихся у штамма альдо-кеторедуктаз;

- транспортные белки, в том числе белки фосфотрансферазных систем, и метаболизма углеводов, белки транспорта и метаболизма мальтозы (AAX72_RS05675–AAX72_RS05680, AAX72_RS11235–AAX72_RS11240);

Таблица 1. Дифференциальная экспрессия генов белков-антиоксидантов штамма *L. brevis* 47f

Фермент/белок	Идентификатор гена	ДЭГ в транскрипционном анализе	
		H ₂ O ₂	O ₂
Гем-зависимая каталаза	AAX72_RS13120	1.81	1.06
АТФаза-переносчик меди	AAX72_RS09325	5.35	1.80
	AAX72_RS09305	2.08	1.28
ДНК-связывающий белок Dps	AAX72_RS12335	6.98	2.64
Диацилглицеролкиназа	AAX72_RS03005	1.38	0.70
	AAX72_RS06875	1.16	0.84
Глутаредоксин NrdH типа	AAX72_RS04510	2.36	0.47
Глутатитонпероксидаза	AAX72_RS08620	7.88	1.68
Гамма-глутамилцистеинсинтетаза (глутаматцистеинлигаза)	AAX72_RS03165	2.7	1.94
Олеатгидратаза (изомераза линолевой кислоты)	AAX72_RS09270	7.66	3.35
NAD(P)/FAD-зависимая оксидоредуктаза	AAX72_RS03320	2.14	0.85
	AAX72_RS11635	4.85	0.76
	AAX72_RS11615	2.74	2.74
	AAX72_RS13105	5.81	2.05
	AAX72_RS04865	20.62	7.80
	AAX72_RS12425	7.00	2.88
	AAX72_RS00845	2.10	1.09
	AAX72_RS07805	4.37	1.53
	AAX72_RS02225	0.37	0.84
	AAX72_RS05210	4.10	1.49
	AAX72_RS07330	1.69	0.51
	AAX72_RS09770	1.47	0.98
	AAX72_RS00765	2.01	1.33
	AAX72_RS03120	0.49	1.06
	AAX72_RS04125	0.65	0.52
	AAX72_RS09445	5.63	3.26
	AAX72_RS09755	1.25	1.73
	AAX72_RS07435	1.85	0.28
	AAX72_RS09930	1.54	2.17
	AAX72_RS05210	4.10	1.49
Тиолпероксидаза	AAX72_RS06165	3.54	1.64
Пероксидаза DuP-типа	AAX72_RS07920	0.98	0.53
Пируватоксидаза	AAX72_RS07840	5.4	1.26
Тиоредоксин	AAX72_RS06600	5.8	1.74
	AAX72_RS05795	11.35	2.15
Тиоредоксинредуктаза	AAX72_RS04745	3.25	1.91
Белок семейства DsbA	AAX72_RS12460	1.66	0.64
АВС-транспортер цистеина CydC	AAX72_RS02950	0.79	1.07
АВС-транспортер цистеина CydD	AAX72_RS02945	0.72	1.09
Пероксидероксин OsmC семейства	AAX72_RS10345	6.00	2.95

Примечание. Цветом выделены значения ДЭГ ≥ 2 и ДЭГ ≤ 0.5 .

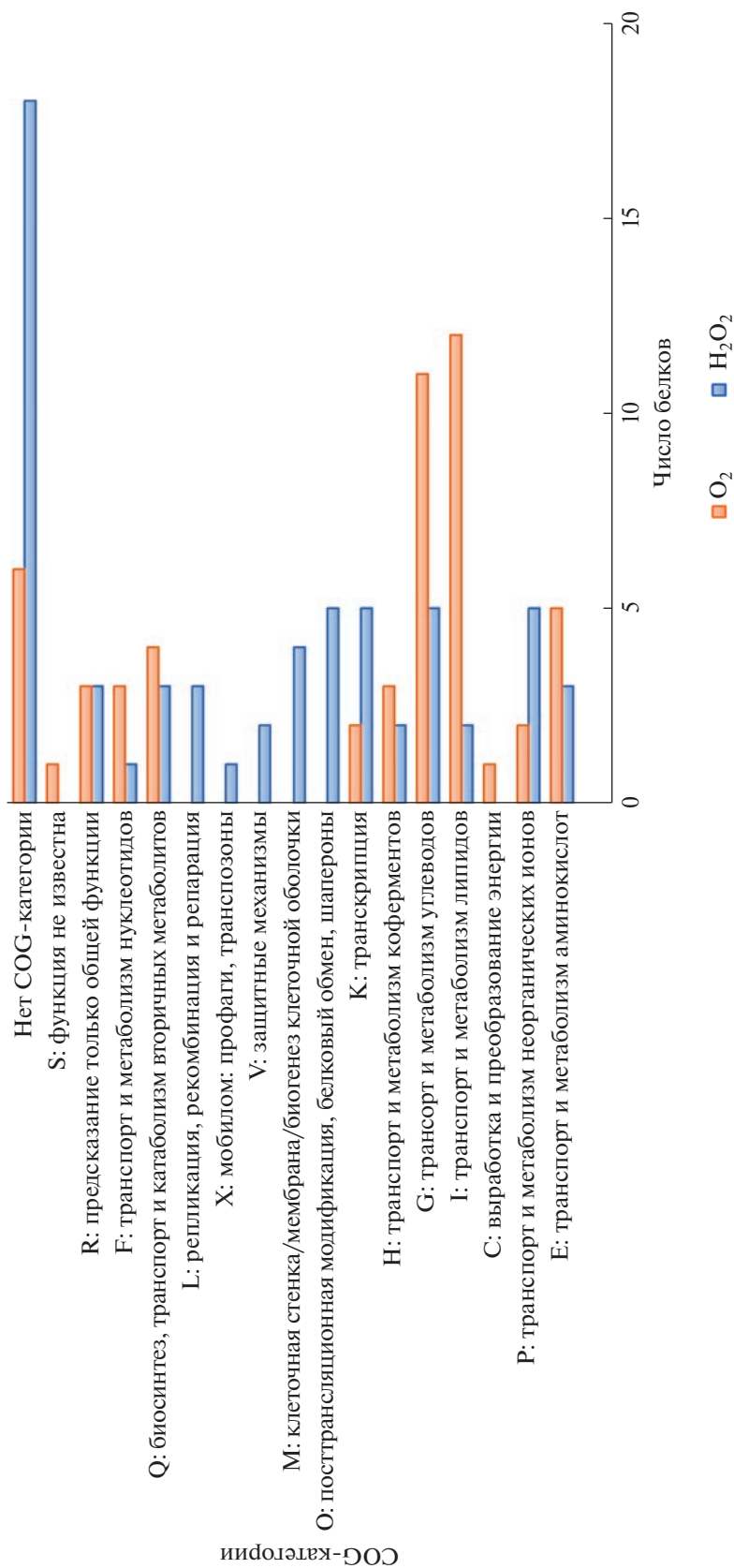


Рис. 3. Распределение белков, соответствующих генам с ДЭ ≥ 5, по категориям COG. Представлены белки, специфические для стресса, вызванного перекисью водорода и кислородом.

– транскетолазу, глицеролдегидрогеназу, белки пируватдегидрогеназного и альфа-кетоглутаратдегидрогеназного комплексов (AAX72_RS03560–AAX72_RS03575).

H₂O₂ специфические гены/белки

В эту группу входят 56 генов с ДЭ ≥ 5 , из них 53 кодируют белки, в том числе:

– молекулярные шапероны (Hsp20, GrpE, Dnak) и HrcA репрессор стрессовых белков класса I. Репрессор III класса стрессовых белков CtsR (AAX72_RS00305) также имеет увеличенную экспрессию (3.33);

– белки-антиоксиданты, кроме перечисленных в разделе “Гены белков-антиоксидантов штамма *L. brevis* 47f” к ним можно отнести нитроредуктазу, белки VIT семейства, белки железосерного кластера (два из них специфичны для H₂O₂ стресса, два являются общими для обоих окислителей);

– альдокеторедуктазы. Из 16 генов четыре дают увеличение ДЭ только при действии перекиси водорода, еще шесть – в случаях обоих окислителей;

– белки транспорта и метаболизма углеводов, а именно пектина (AAX72_RS07760–AAX72_RS07770);

– трансальдолазу, фермент пентозофосфатного пути;

– белки репарации ДНК: ДНК-полимераза Y-семейства, ДНК-полимераза IV DinB, экзонуклеаза UvrB;

– белки биогенеза клеточной стенки: глутаматрацемаза, глутамин-фруктозо-6-фосфаттрансаминаза GlmS, белок, содержащий LysM-домен;

– белки синтеза аминокислот с разветвленными боковыми цепями (ацетолактатдегидрогеназа и ацетолактатсинтаза).

O₂ специфические гены/белки

В эту группу входят 44 гена с ДЭ ≥ 5 , из них 42 кодируют белки.

Эта группа генов включает два протяженных предполагаемых оперона. Один из них, включающий пять генов (AAX72_RS03140–AAX72_RS03160), объединяет гены пуринового и пиримидинового метаболизма. Другой, содержащий 15 генов (AAX72_RS01100–AAX72_RS01170), определяет биосинтез длинноцепочечных жирных кислот. В эту группу входит также ряд белков метаболизма углеводов ($N = 10$), в том числе белки фосфокетолазного пути (лактатдегидрогеназа, глюкокиназа, фруктозопермеаза), маннитолдегидрогеназа, белки, осуществляющие импорт пептидов, аминокислот и сахаров.

ОБСУЖДЕНИЕ

Судя по числу и значениям ДЭГ, оба окислителя оказывают сильное действие на штамм, увеличивая или снижая экспрессию генов. 315 генов (33% для H₂O₂ и 46% для O₂) изменяют экспрессию при действии обоих окислителей. Такой общий ответ на действие различных стрессовых факторов неоднократно отмечался для других лактобацилл [21, 22] и объясняет перекрестную адаптацию лактобацилл к различным стрессовым факторам [23, 24].

Нужно отметить, что среди генов с ДЭ есть большое число генов с неизвестными функциями. 34% белков, соответствующих генам с ДЭ ≥ 5 для H₂O₂ и 19% для O₂, не могут быть отнесены к конкретной COG-категории (рис. 3).

Гены белков, отнесенных к АО, в подавляющем большинстве увеличивают экспрессию; при действии перекиси активизируется значительно большее число таких генов, чем при действии кислорода.

Гены/белки, активизирующиеся при действии обоих окислителей, это стрессовые белки, белки АО защиты, белки репарации белков и нуклеотидов, белки клеточной стенки. Также активизируются гены транспорта и метаболизма углеводов, белки, входящие в катаболические пути запасания энергии.

Разделение генов/белков с ДЭ по COG-категориям различно для двух стрессовых факторов. Под действием перекиси усиливается экспрессия генов репарации, шаперонов, защитных механизмов, биогенеза клеточной стенки. При действии кислорода усиливается экспрессия большого числа генов транспорта и метаболизма липидов и углеводов.

При действии перекиси активизируется транскрипция в основном белков защиты: белков стрессового ответа и молекулярных шаперонов, антиоксидантных белков, белков репарации ДНК, белков, участвующие в формировании клеточной стенки, которые также выполняют защитную функцию. Необычным следует отметить факт увеличения экспрессии пяти генов, чья активность связана с поглощением и метаболизмом пектина. В стрессовых условиях активизируются нестандартные пути метаболизма углеводов – в данном случае можно предположить использование катаболизма пектина как источника энергии.

Кислород активизирует оперон генов пуринового и пиримидинового метаболизма. Возможно, соответствующие ферменты вовлекаются в нуклеотидный (salvage, реутилизационный) путь, когда биологические продукты образуются из промежуточных продуктов деградации [25]. Кроме того, в необычных условиях бактерии могут использовать нуклеозиды как источники углерода и

энергии [26]. Другой активируемый оперон кодирует гены синтеза жирных кислот. Первичная роль бактериальных жирных кислот состоит в том, что они являются гидрофобными компонентами мембранных липидов. Кроме того, жирные кислоты являются энергетическим депо, при их расщеплении выделяется больше энергии на грамм вещества, чем при разложении глюкозы [27]. Индукция синтеза жирных кислот отмечалась при действии на клетки штамма *L. brevis* ATCC367 н-бутанола [28]. В целом в аэробных условиях в значительной степени активируются гены, определяющие белки преобразования энергии (использование в качестве источника энергии, помимо глюкозы, фруктозы, жирных кислот, нуклеозидов; белки фосфокетолазного пути) и импорта пептидов, аминокислот, сахаров.

Сравнение с другими работами осложнено тем, что экспрессия генов зависит от многих факторов: стадии роста культуры, способа применения оксиданта, выбранного вида и даже штамма бактерий [29]. Поэтому можно говорить только об общих закономерностях реакции лактобацилл на действие оксидантов. В ответе *Limosilactobacillus reuteri* на действие перекиси водорода отмечалась активизация генов белков-АО, белков защиты от повреждений, вызываемых перекисью (метионинсульфоксидредуктаза), белков репарации ДНК и транспорта металлов [21]. При действии перекиси на штамм *Lactiplantibacillus plantarum* CAUH2 также увеличивалась экспрессия генов белков-АО, систем репарации ДНК и белков, шаперонов [30]. У штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21 под действием перекиси увеличивалась экспрессия генов стрессового ответа, метионинсульфоксидредуктаз, полифосфаткиназы, синтеза ряда аминокислот, фосфотрансферазных систем транспорта сахаров [31]. В большинстве работ отмечается увеличение экспрессии генов стрессового ответа, белков-АО, белков репарации ДНК и белков. В аэробных условиях у штамма *L. plantarum* WCFS1 отмечается увеличение экспрессии генов пируватдегидрогеназного и малатдегидрогеназного путей [32]. У штамма *Lentilactobacillus buchneri* CD034 в аэробных условиях увеличена экспрессия генов глутатионредуктазы, пероксидазы, шаперонов, пируватоксидаз, лактатоксидазы, генов семейства короткоцепочечных алкогольдегидрогеназ [33]. Наряду с изменением экспрессии генов стрессового ответа и белков-АО отмечается изменение экспрессии генов энергетических процессов. Однако в случае каждого конкретного штамма активируются специфические гены, т.е. ответ бактериальной клетки на стресс достаточно индивидуален.

Суммируя, можно заключить, что действие перекиси водорода и кислорода на штамм *L. brevis*

47f активизирует экспрессию как общих генов, так и специфических для каждого оксиданта. При действии перекиси в основном активируются гены защитных механизмов, при действии кислорода — в основном гены, связанные с выработкой и преобразованием энергии.

Полученные в настоящей работе результаты будут использованы нами при интегрированном анализе совокупности транскриптомных, протеомных и метаболомных данных по данному штамму. Это внесет значительный вклад в создание на основе *L. brevis* 47f фармабиотика для лечения различных воспалительных заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-54-18006. Участие В.Н. Даниленко и Е.У. Полуэктовой финансировалось также в рамках госзадания № 0092-2022-0003.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feyereisen M., Mahony J., Kelleher P. et al. Comparative genome analysis of the *Lactobacillus brevis* species // BMC Genomics. 2019. V. 20. № 1. Article 416. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5783-1>
2. Kim K.T., Yang S.J., Paik H.D. Probiotic properties of novel probiotic *Levilactobacillus brevis* KU15147 isolated from radish kimchi and its antioxidant and immune-enhancing activities // Food Sci. Biotechnol. 2021. V. 30. P. 257–265. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00853-0>
3. Stankovic M., Veljovic K., Popovic N. et al. *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 and *Lb. plantarum* BGPKM22 exhibit anti-inflammatory effect by attenuation of NF-κB and MAPK signaling in human bronchial epithelial cells // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 10. <https://doi.org/10.3390/ijms23105547>
4. Kumar S., Praneet N.S., Suchiang K. *Lactobacillus brevis* MTCC 1750 enhances oxidative stress resistance and lifespan extension with improved physiological and functional capacity in *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16 pathway // Free Radic. Res. 2022. V. 56. № 7–8. P. 555–571. <https://doi.org/10.1080/10715762.2022.2155518>
5. Danilenko V., Devyatkin A., Marsova M. et al. Common inflammatory mechanisms in COVID-19 and Parkinson's diseases: The role of microbiome, pharmabiotics and postbiotics in their prevention // J. Inflamm. Res. 2021. V. 14. P. 6349–6381. <https://doi.org/10.2147/JIR.S333887>

6. Yunes R.A., Poluektova E.U., Belkina T.V., Danilenko V.N. Lactobacilli: Legal regulation and prospects for new generation drugs // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 652–664.
<https://doi.org/10.1134/S0003683822050179>
7. Sporer A.J., Kahl L.J., Price-Whelan A., Dietrich L.E.P. Redox-based regulation of bacterial development and behavior // Ann. Rev. Biochem. 2017. V. 86. P. 777–797.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044453>
8. Zotta T., Parente E., Ricciardi A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: Impact on stress response and potential applications in the food industry // J. Appl. Microbiol. 2017. V. 122. № 4. P. 857–869.
<https://doi.org/10.1111/jam.13399>
9. Zotta T., Ricciardi A., Ianniello R.G. et al. Aerobic and respirative growth of heterofermentative lactic acid bacteria: A screening study // Food Microbiol. 2018. V. 76. P. 117–127.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.017>
10. Bryukhanov A.L., Klimko A.I., Netrusov A.I. Antioxidant properties of lactic acid bacteria // Microbiology. 2022. V. 91. P. 463–478.
<https://doi.org/10.1134/S0026261722601439>
11. Yunes R.A., Poluektova E.U., Dyachkova M.S. et al. GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota // Anaerobe. 2016. V. 42. P. 197–204.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.10.011>
12. Marsova M., Abilev S., Poluektova E., Danilenko V. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of lactobacillus strains from human microbiota // World J. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 34. № 2. Article 27.
<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2410-2>
13. Marsova M., Odorskaya M., Novichkova M. et al. The *Lactobacillus brevis* 47f strain protects the murine intestine from enteropathy induced by 5-fluorouracil // Microorganisms. 2020. V. 8. № 6.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8060876>
14. Olekhovich E.I., Batotsyrenova E.G., Yunes R.A. et al. The effects of *Levilactobacillus brevis* on the physiological parameters and gut microbiota composition of rats subjected to desynchronization // Microbial. Cell Factories. 2021. V. 20. Article 226.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01716-x>
15. DeMan J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Microbiol. 1960. V. 23. № 1. P. 130–135.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
16. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. V. 30. № 15. P. 2114–2120.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
17. Kim D., Paggi J.M., Park C. et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. № 8. P. 907–915.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
18. Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools // Gigascience. 2021. V. 10. № 2.
<https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
19. Putri G.H., Anders S., Pyl P.T. et al. Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0 // Bioinformatics. 2022.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac166>
20. Averina O.V., Poluektova E.U., Marsova M.V., Danilenko V.N. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic Lactobacilli and bifidobacteria as representatives of the human gut microbiota // Biomedicines. 2021. V. 9. № 10.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9101340>
21. Basu Thakur P., Long A.R., Nelson B.J. et al. Complex responses to hydrogen peroxide and hypochlorous acid by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* // mSystems. 2019. V. 4. № 5.
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00453-19>
22. Zhang C., Gui Y., Chen X. et al. Transcriptional homogenization of *Lactobacillus rhamnosus* hsrlym 1301 under heat stress and oxidative stress // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. № 6. P. 2611–2621.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10407-3>
23. Huang R., Pan M., Wan C. et al. Physiological and transcriptional responses and cross protection of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 under acid stress // J. Dairy Sci. 2016. V. 99. № 2. P. 1002–1010.
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-9993>
24. Zhang C., Lu J., Yang D. et al. Stress influenced the aerotolerance of *Lactobacillus rhamnosus* hsrlym 1301 // Biotechnol. Lett. 2018. V. 40. P. 729–735.
<https://doi.org/10.1007/s10529-018-2523-6>
25. Kilstrup M., Hammer K., Jensen P.R., Martinussen J. Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 2005. V. 29. № 3. P. 555–590.
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.006>
26. Tozzi M.G., Camici M., Mascia L. et al. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism // FEBS J. 2006. V. 273. № 6. P. 1089–1101.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.01555.x>
27. De Carvalho C.C.R., Caramujo M.J. The various roles of fatty acids // Molecules. 2018. V. 23. № 10.
<https://doi.org/10.3390/molecules231025832018>
28. Winkler J., Kao K.C. Transcriptional analysis of *Lactobacillus brevis* to N-butanol and ferulic acid stress responses // PLoS One. 2011. V. 6. № 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021438>
29. Maresca D., Zotta T., Mauriello G. Adaptation to aerobic environment of *Lactobacillus johnsonii/gasseri* strains // Front. Microbiol. 2018. V. 9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00157>
30. Zhai Z., Yang Y., Wang H. et al. Global transcriptomic analysis of *Lactobacillus plantarum* CAUH2 in response to hydrogen peroxide stress // Food Microbiol. 2020. V. 87.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103389>
31. Полуэктова Е.У., Мавлетова Д.А., Одорская М.В. и др. Сравнительный геномный, транскриптомный и

- протеомный анализ штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21, перспективного для создания фармабиотика // Генетика. 2022. Т. 58. № 9. С. 1029–1041.
<https://doi.org/10.31857/S0016675822090120>
32. Stevens M.J.A., Wiersma A., de Vos W.M. et al. Improvement of *Lactobacillus plantarum* aerobic growth as directed by comprehensive transcriptome analysis // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 15. P. 4776–4778.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00136-08>
33. Eikmeyer F.G., Heintz S., Marx H. et al. Identification of oxygen-responsive transcripts in the silage inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 by RNA sequencing // PLoS One. 2015. V. 10. № 7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134149>

Transcriptomic Analysis of the *Levilactobacillus brevis* 47f Strain under Oxidative Stress

E. U. Pouektova^{a, *}, O. V. Averina^a, A. S. Kovtun^a, and V. N. Danilenko^a

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: epolu@vigg.ru

Levilactobacillus brevis 47f is a heterofermentative aerotolerant lactic acid bacterium isolated from the microbiota of the gastrointestinal tract of a healthy person. Previously, the strain showed anti-inflammatory properties and protects the murine intestine from enteropathy induced by 5-fluorouracil as part of preclinical studies. At the same time, the molecular mechanisms that account for the properties of the strain and its response to the action of reactive oxygen species, remain unexplored. The aim of this work was to study the response of the strain to the action of oxidizing agents – hydrogen peroxide and oxygen – using the method of transcriptional RNAseq analysis. Both oxidants exhibited a strong effect on the strain, increasing or decreasing the expression of several hundred genes – both general and specific for each oxidant. The characteristics of proteins whose expression was increased the most ($DE \geq 5$) are provided. The genes activated under the action of both oxidants encode proteins related to stress, antioxidant activity, protein and nucleotide repair, cell wall, carbohydrate transport and metabolism, and catabolic energy storage pathways. Peroxide mainly activated the transcription of defense proteins, namely, stress response and molecular chaperones, antioxidant activity, DNA repair, and proteins involved in the formation of the cell wall. Under aerobic conditions, the genes that encode proteins involved in energy conversion (the use of fatty acids, nucleosides, fructose in addition to glucose as an energy source; proteins of the phosphoketolase pathway) and the import of peptides, amino acids, and sugars, were activated to a large extent. The data obtained in this work will be used by us to conduct an integrated analysis of transcriptomic, proteomic, and metabolomic data derived from this strain. This will make a significant contribution to the creation of a pharmacobiotic based on *L. brevis* 47f for the treatment of various inflammatory diseases.

Keywords: transcriptomic analysis, *Levilactobacillus brevis*, hydrogen peroxide, aerobic growth.