

РЕАКЦИЯ ШТАММА *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

© 2023 г. О. В. Аверина^{1, *}, А. С. Ковтун¹, Д. А. Мавлетова¹, Р. Х. Зиганшин², В. Н. Даниленко¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

*e-mail: olgavr06@mail.ru

Поступила в редакцию 20.02.2023 г.

После доработки 14.03.2023 г.

Принята к публикации 15.03.2023 г.

Бифидобактерии являются преобладающей популяцией в микробиоте кишечника человека. Несмотря на растущее число данных о полезных свойствах бифидобактерий для здоровья человека, знаний об их антиоксидантном потенциале по-прежнему недостаточно. Роль антиоксидантного потенциала бифидобактерий в поддержании гомеостаза микробиоты кишечника организма хозяина в целом — важнейшая задача, требующая решений. Впервые представлены результаты геномного, транскриптомного и протеомного анализов штамма *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 после действия окислительного стресса. Растущую культуру штамма подвергали воздействию перекиси водорода в течение двух часов и кислорода в течение двух и четырех часов. Предварительный анализ генома штамма показал наличие 17 генов, кодирующих белки с известной антиоксидантной функцией, как и в других геномах *B. longum* subsp. *infantis*, доступных в международной базе данных NCBI. Полнотранскриптомный анализ выявил увеличение уровней транскриптов более чем в 2 раза для шести генов с известной антиоксидантной функцией. Данные количественного протеомного анализа показали повышение уровней белков более чем в 2 раза для пяти ферментов с известной антиоксидантной функцией. Более 28 других белков с повышенными уровнями более чем в 2 раза были идентифицированы в клетках растущей культуры штамма в ответ на продолжительное действие кислорода. Эти белки могут быть вовлечены в процессы ответа клетки на стресс, метаболизм аминокислот, нуклеотидов и в транспортные процессы. В клетках после действия стресса выявлен высокий уровень у шести белков с неизвестными функциями, которые могут играть значимую роль в антиоксидантной защите анаэробных бифидобактерий. Полученные данные предполагается применить при отборе штаммов *B. longum* subsp. *infantis* и создании на их основе пробиотиков, способных корректировать состав микробиоты.

Ключевые слова: бифидобактерии, геномный анализ, транскриптомный анализ, протеомный анализ, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0016675823080039, EDN: XSJCWK

Род *Bifidobacterium* является одной из преобладающих бактериальных популяций в микробиоте кишечника человека. Их положительная функциональная роль для здоровья человека хорошо охарактеризована [1]. Количество бифидобактерий у младенцев, родившихся вагинальным путем и находящихся на грудном вскармливании, составляет 90% от общей микробиоты кишечника. Далее количество бифидобактерий в толстой кишке взрослых снижается до 5% и еще больше снижается у пожилых людей [2]. Одним из важных свойств бифидобактерий является устойчивость к действию оксидантов и активных форм кислорода (АФК) и способность к повышению антиоксидантного (АО) и противовоспалительного статуса организма хозяина [3–5].

Бифидобактерии — грамположительные микроорганизмы из класса Actinobacteria с высоким содержанием G+C. Как и большинство бактерий толстой кишки, бифидобактерии — строгие анаэробы, поэтому кислород может быть важным фактором стресса, с которым им надо справляться. Известно, что воздействие кислорода вызывает накопление АФК, главным образом H₂O₂, которые могут вызывать вредные эффекты, включая неправильное свертывание и агрегацию белков, повреждение ДНК и перекисное окисление липидов, что приводит к гибели клеток. Многочисленные *in vivo* и *in vitro* исследования продемонстрировали, что бифидобактерии и их клеточные компоненты обладают АО способностью, которая обеспечивает определенную степень защиты

от окислительного повреждения как их собственных клеток, так и клеток их хозяев [5]. Бифидобактерии могут проявлять АО активность посредством различных механизмов: хелатирования токсичных ионов (Fe_2^+ и Cu_2^+); синтеза АО-ферментов, пептидов и тиолов; соединений со свойствами АО [5]. Однако АО активность специфична для штамма и не является общей даже для вида [6, 7]. Ранее проведенные исследования выявили у штаммов *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* чувствительность к кислороду (растут в присутствии 5% O_2 в жидкой культуре), у *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* и *Bifidobacterium adolescentis* гиперчувствительность к кислороду (рост ингибируется в условиях 5% O_2) [8]. Однако было показано, что штаммы *B. longum*, *B. infantis* способны к росту при периодическом встряхивании на качалке [9]. Анализ последовательности геномов *B. longum* показал отсутствие генов для NADH-пероксидазы или супероксиддисмутазы, хотя имеется гомолог для NADH-оксидазы [10]; присутствуют гены, кодирующие ферменты, уменьшающие окислительное повреждение, а именно алкилгидропероксидредуктазу (*ahpC*) [11], тиоредоксинредуктазу [12] и другие [5].

В последние годы наблюдается растущий интерес к бифидобактериям в качестве препаратов для лечения и профилактики различных заболеваний, сопровождаемых развитием окислительного стресса. Это определяет увеличение спроса к использованию бифидобактерий в качестве фармабиотиков, биологически активных добавок и в составе функциональных продуктов питания.

Успешное применение бифидобактерий зависит не только от научных исследований их свойств, которые демонстрируют эффективность в обеспечении пользы для здоровья человека, но и от разработки технологий, обеспечивающих выживание в больших количествах во время производственного культивирования и поддержание во время длительного хранения [13]. Повреждение клеток АФК является одной из основных причин потери жизнеспособности анаэробных пробиотиков, таких как бифидобактерии, и поэтому оказывает большое влияние на их коммерческое применение.

Несмотря на растущее число исследований полезной функциональности бифидобактерий для здоровья человека [14], знаний об их АО потенциале все еще недостаточно. В связи с этим в ближайшем будущем следует уделять все больше внимания изучению ответа бифидобактерий на окислительный стресс (ОС). В настоящей работе впервые представлены результаты геномного, транскриптомного и протеомного анализов штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. Штамм выделен из кишечника ребенка, его геном секвенирован и хорошо описан [15]. Бактерии *B. longum* subsp. *in-*

fantis являются подвидом вида *Bifidobacterium longum* — наиболее распространенного и стабильного на протяжении жизни человека. Для понимания механизма АО защиты клеток *B. longum* subsp. *infantis* на ОС мы изучали растущую культуру штамма при действии перекиси водорода в течение двух часов и кислорода в течение двух и четырех часов. Бактерии *B. longum* subsp. *infantis* являются доминирующими в бифидофлоре кишечника детей раннего возраста, находящихся на грудном вскармливании [16], поэтому углубление знаний об АО защите как самих клеток бифидобактерий, так и их хозяина имеет большое значение для будущей разработки стратегий для выживания в составе микробиоты младенца. Полученные данные предполагается применить при отборе штаммов *B. longum* subsp. *infantis* и создании на их основе фармабиотиков, способных корректировать состав микробиоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, среды, условия культивирования

Культуру штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 из коллекции лабораторных культур выращивали при 37°C в бульоне Mann Rogosa Sharp (MRS) с добавлением 0.05% L-цистеина HCl в анаэробных условиях в анаэроостате HiAnaerobic System-MarkIII, HiMedia (Индия).

Воздействие на культуру B. infantis окислительного стресса

Культуру выращивали в жидкой среде MRS с цистеином до середины экспоненциальной фазы роста (OD_{600} 0.5–0.6) в анаэробных условиях при 37°C. Контрольную часть культуры отбирали до окислительного стресса и через 2 ч инкубации в анаэробных условиях. Для эксперимента культуру после центрифугирования (при 28°C и 7500 об./мин) и замены среды с цистеином на среду без него разделяли на три части: две части культивировали на качалке при 250 об./мин и 37°C в течение двух и четырех часов, в одну часть добавляли H_2O_2 до 1 мм и инкубировали при 37°C в аэробных условиях в течение двух часов.

Выделение мРНК и дальнейшее секвенирование

Клетки из культуральной жидкости (10^8 кое/мл) собирали центрифугированием (1 мин 12000 об./мин) и осадок ресуспендировали в 100 мкл TE-буфера (30 mM Tris HCl, 1 mM этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), pH 8.0) с добавлением лизосима (20 мг/мл) и инкубировали в течение 10 мин при 37°C. К суспензии добавляли 350 мкл буфера для лизиса (4.5 mM гуанидин/HCl, 50 mM Tris HCl, 30% Тритон X-100, pH 6.6). Клетки разруша-

ли механическим путем с шариками кремнезема (диаметром 150–212 мкм) на приборе Speed Mill plus (Analytik Jena, Германия). РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы с РНК обрабатывали DNaseI для разрушения остатков ДНК. Чистота образцов РНК тестировалась на приборе Nano Drop™. С помощью биоанализатора Agilent 2100 (Agilent RNA 6000 NanoKit) в образцах было определено общее количество РНК, RIN, 23S/16S. Образцы РНК были обработаны набором Ribo-off rRNA Depletion Kit (Bacteria) для удаления рРНК (16S и 23S), сохраняя мРНК. Далее библиотеки для секвенирования были подготовлены набором MGIEasy RNA Directional Library Prep Set по протоколу производителя. Полученная одноцепочечная кольцевая ДНК (ssCirDNA) была синтезирована как окончательная библиотека. Библиотека была амплифицирована с помощью полимеразы phi29 для получения ДНК-шариков. Они были загружены в наночип для парноконцевого секвенирования длиной 100 пн на платформе DNBseq(BGI). Секвенированные образцы транскриптома были проанализированы на наличие ошибок прочтения с использованием FastQC v 0.11.5 [17]. Качество секвенирования улучшалось с помощью Trimmomatic v0.39 [18].

Каталог ортологов генов, кодирующих продукты с антиоксидантной активностью

Составляли список антиоксидантов, продуцируемых бактериями рода *Bifidobacterium*. Затем выполняли поиск референсных аминокислотных последовательностей к генам, ответственных за метаболизм выбранных антиоксидантов. Выбирались только последовательности, экспериментально подтвержденные в исследовательских работах. Затем эти референсные последовательности были использованы для поиска ортологов у бактерий вида *B. longum* с использованием BLAST [19] и базы данных NCBI Protein2022.

*Анализ геномов *B. longum* subsp. *infantis**

Для анализа распространения генов из каталога ортологов среди бактерий *B. longum* subsp. *infantis* из базы данных NCBI Assembly были загружены опубликованные геномные сборки. Использовались только геномы со статусом сборки “полный”. Для идентификации гомологов генов из референсного каталога использовали программу blastx. Пороги для фильтрации выравниваний: минимальная идентичность 60%, минимальная относительная длина выравнивания 80%.

Анализ экспрессии генов антиоксидантов

Анализ уровней экспрессии генов, ответственных за антиоксидантные свойства, в секвенированных образцах штамма проводили с использованием собранного каталога ортологов. Чтения транскриптома были картированы на аминокислотные последовательности с помощью DIAMOND v2.0.13 [20]. Выравнивания были отфильтрованы с помощью пользовательских скриптов, написанных на языке программирования Perl, по следующим пороговым значениям: идентичность $\geq 60\%$ и относительная длина выравнивания $\geq 90\%$. Множественные выравнивания были отфильтрованы. После этого количество чтений, выровненных с каждым геном, было подсчитано и нормализовано.

Анализ полного транскриптома

Эталонные геномы и их аннотации из базы данных RefSeq были загружены по соответствующим идентификаторам для *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 GCF_001010995.1. Далее использовали hisat2 v2.2.1 [21] для картирования проверенных на качество транскриптомных чтений секвенированных образцов. Картирования были отфильтрованы с помощью программного пакета SAMtools v1.10 [22]. Количество чтений на транскрипт оценивалось с помощью HTSeq-count v2.0.2 [23].

Пробоподготовка образцов для хромато-масс-спектрометрического анализа

Клетки штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 выращивали в среде MRS до экспоненциальной фазы роста (OD_{600} 0.5–0.6). Клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 7000 об./мин в течение 30 мин, при 4°C. Осадок клеток трижды промывали раствором PBS, pH 7.4. Далее клетки ресуспендировали в растворе PBS, pH 7.4, предварительно преинкубированном при 95°C в течение 20 мин в соотношении 1 : 10. Затем клетки инкубировали при 95°C в течение 10 мин. Клетки лизировали с использованием ультразвукового дезинтегратора VibraCell™ Ultrasonic Processor (Sonics, США) при частоте 20 кГц трижды по 15 с с интервалом между обработками 10 с при 4°C. Обломки клеточных стенок отделяли центрифугированием при 17000 об./мин в течение 20 мин при 4°C. Концентрацию белков определяли на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США) согласно рекомендации производителя.

Гидролиз белков трипсином

Аликвоты растворов лизатов клеток, содержащие 20 мкг белка, высушивали досуха на центрифужном вакуумном концентраторе SpeedVac (Savant, Франция) и растворяли в 20 мкл буферного раствора, содержащего 100 мМ Трис pH 8.5, 1%

дезаксихолата натрия, 10 мМ ТСЕР (Tris (2-carboxyethyl) phosphine) и 20 мМ 2-САО (2-хлороацетамид), прогревали в течение 20 мин при 85°C, охлаждали до комнатной температуры, добавляли 0.4 мкг трипсина в 10 мкл 100 мМ Трис pH 8.5 и оставляли инкубироваться при 37°C на ночь. По окончании инкубации к реакционной смеси добавляли равный объем 2% ТФУ и пептиды обессоливали на микроколонке SDB-RPS Stage Tip, изготовленной из наконечника для автоматической пипетки на 200 мкл и трех кусочков мембраны SDB-RPS (3М, США), вырезанных иглой калибром 16 [24]. Раствор пептидов наносили на микроколонку центрифугированием при 300 g, промывали смесью растворителей 50 мкл 1% ТФУ: 50 мкл этилацетата (3 раза), 50 мкл 0.2% ТФУ и элюировали 50 мкл раствора, содержащего 5% гидроксида аммония и 80% ацетонитрила в воде. Элюат высушивали досуха и хранили при –80°C. Перед анализом пептиды растворяли в 40 мкл раствора, содержащего 0.1% ТФУ и 2% ацетонитрила в воде.

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Образцы загружали на изготовленную предколонку 50 × 0.1 мм, упакованную сорбентом Inertsil ODS3 3 μm (GLSciences), в растворе, содержащем 2% ацетонитрила, 98% H₂O, 0.1% ТФУ, при скорости потока 10 мкл/мин и разделяли при комнатной температуре на колонке из плавленого кварца 300 × 0.1 мм с эмиттером, изготовленной на приборе P2000 Laser Puller (Sutter, USA) и упакованной сорбентом Reprosil PURC18AQ 1.9 (Dr. Maisch). Обращенно-фазную хроматографию проводили на хроматографе Ultimate 3000 Nano LC System, соединенном с масс-спектрометром QExactive Plus Orbitrap mass spectrometer посредством наноэлектроспрейного источника. Для хроматографического разделения пептидов использовали систему растворителей А (99.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты) и Б (19.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты, 80% ацетонитрила). Пептиды элюировали с колонки линейным градиентом: 3% Б 3 мин, 3–6% Б 2 мин, 6–30% Б 50 мин, 30–55% Б 10 мин, 55% Б 2 мин, 55–99% Б 0.1 мин, 99% Б 2 мин, 3–99% Б 0.1 мин при скорости потока 500 нл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме DDA (TopN=10) со следующими настройками прибора: MS1 сканирование: разрешение 70000, диапазон сканирования 200–1600 m/z, максимальное время инъекции ионов – 35 мс, уровень AGC – 3 × 10⁶; MS2 сканирование: разрешение 17500, HCD фрагментация с энергией 30%, максимальное время инъекции ионов – 80 мс, уровень AGC – 1 × 10⁵.

Анализ масс-спектрометрических данных

Масс-спектрометрические данные анализировали при помощи компьютерной программы Peaks studio 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc.) [22, 25]. Идентификацию белков проводили посредством корреляции тандемных масс-спектров с базой данных белковых последовательностей *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 Uniprot (19.09.2022) со следующими параметрами: постоянная модификация Cys – карбамидометилирование, переменные модификации – деамидирование Asn/Gln и окисление Met, допустимый уровень ложноположительных identifications пептидов – 0.01 (определялся по реверсной базе данных аминокислотных последовательностей), специфичность протеазы – C-конец Arg и Lys (при поиске в базе данных допускалось до двух пропущенных сайтов гидролиза). При идентификации пептидов допускалось отклонение экспериментально полученной массы пептида от его теоретической массы до 10 млн долей, а отклонение массы фрагментов – до 0.05 Да.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Геномный анализ антиоксидантного потенциала бактерий *B. longum* subsp. *infantis*

Ферменты и другие клеточные соединения и метаболиты, отвечающие на действие окислительного стресса у представителей вида *B. longum*, были отобраны после анализа доступных опубликованных данных и представлены в обзорной статье [5]. К генам, подобранным к белкам с выявленной антиоксидантной функциональностью, были подобраны ортологи. Ортологи выявляли как описано в разделе “Материалы и методы” в геномах видов бифидобактерий – комменсалов кишечника человека. Аминокислотные последовательности отобранных ортологов собраны в каталог, который включал 203 последовательности для 27 белков (табл. S1). Аминокислотные последовательности ортологов в FASTA формате доступны в базе данных на сайте <https://github.com/Alexey-Kovtun/Catalog>. Затем было проанализировано наличие генов из каталога в полных геномах различных штаммов подвида *B. infantis*. Данные о наличии в геномах различных штаммов подвида *B. longum* subsp. *infantis* 17 генов, кодирующих субъединицу С алкилгидропероксидредуктазы (*ahpC*), субъединицу F алкилгидропероксидредуктазы (*ahpF*), пиридин-нуклеотид-дисульфидоксидоредуктазу класса I, оксидоредуктазу DSBA, дигидрооротатдегидрогеназу, глутаредоксин (*grxC2*), глутатион АТФ-связывающий белок (*gsiA*), изомеразу линолевой кислоты, NADH-оксидазу, АТФазу Р-типа, пермеазу, пероксиредоксин, белок с доменом тиоредоксина, тиоредоксинпероксидазу, тиоредоксинредуктазу, сериновую протеазу, представлены в табл. S2. Эта таблица включает данные по геному

штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, у которого также выявлено присутствие этих генов, кроме гена, кодирующего сериновую протеазу.

Для определения функциональности выявленных генов и других генов с антиоксидантными свойствами был проведен общий транскриптомный анализ растущей культуры штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, подвергнутой воздействию H_2O_2 и кислорода.

Транскриптомный анализ антиоксидантного ответа штамма B. longum subsp. infantis ATCC 15697

Для полного транскриптомного анализа использовали культуру штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 в фазе экспоненциального роста, которую подвергали воздействию перекиси водорода в течение двух часов и кислорода в течение двух и четырех часов. Эти условия были использованы для приближения к среде обитания бифидобактерий в кишечном тракте с возможным окислительным стрессом во время воспалительных процессов или во время промышленных процессов производства бактериального препарата.

Общую РНК выделяли из культуральных клеток, отобранных до (контроль) и после воздействия окислительного стресса, и секвенировали на устройстве DNBSEQ System после подготовки образца. Образцы транскриптома штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 были секвенированы как парные концевые считывания длиной 100 пн. Полные параметры образцов представлены в табл. S3. Процедура проверки качества показала, что образцы подходят для анализа и их размеры не сильно уменьшились после обрезки. Общий объем данных почти равномерно распределен по выборкам. Транскриптомные считывания были выровнены по справочному каталогу с помощью DIAMOND и отфильтрованы, как описано в разделе “Материалы и методы”. Количество оставшихся прочтений, использованных для оценки уровней экспрессии, составило 466051, 439089, 316276, 523810 и 375600. Транскриптомные чтения были нанесены на карту генома *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 с использованием HTSeq-2. Общее количество чтений, использованных для дальнейшей оценки уровней экспрессии, составило 28334402 (контроль 1), 28733996 (контроль 2), 27525358 (H_2O_2 – 2 ч), 28459072 (O_2 – 2 ч) и 26529750 (O_2 – 4 ч).

Общее количество генов с идентифицированными транскриптами составило 2647. Из них увеличение уровней более чем в 2 раза было обнаружено для транскриптов 243 генов в ответ на H_2O_2 , 67 генов в ответ на действие O_2 в течение двух часов и 99 генов в ответ на действие O_2 в течение четырех часов. Используя каталог ортологов для по-

иска генов, кодирующих продукты с антиоксидантным действием, среди транскриптов было выявлено шесть различных генов, которые представлены в табл. 1. В основном окислительный стресс повлиял на увеличение уровней транскриптов более чем в 2 раза для генов, кодирующих белок с доменом тиоредоксина, тиоредоксинредуктазу, АТФазу Р-типа, изомеразу линолевой кислоты и пиридиннуклеотид-дисульфидоксидоредуктазу класса 1. Транскрипты генов, кодирующих тиоредоксинредуктазу, были увеличены в 9.27 раз после воздействия H_2O_2 и в 2.13 раза после действия O_2 в течение четырех часов инкубации. Транскрипты для белка с тиоредоксиновым доменом увеличены в 2.66 раз после воздействия H_2O_2 . Все стрессовые воздействия спровоцировали увеличение транскрипта АТФазы Р-типа в 19.92 раз при действии H_2O_2 , в 2.05 раз при действии O_2 в течение двух часов и 3.68 раз при действии O_2 в течение четырех часов инкубации. Транскрипты для гена, кодирующего изомеразу линолевой кислоты, были увеличены в 5.31 раз только при воздействии H_2O_2 . Транскрипты для гена, кодирующего пиридиннуклеотид-дисульфидоксидоредуктазу класса 1, были увеличены в 2.4 и 1.71 раз и для гена пермеазы увеличены в 2.57 и 2.54 раз только при действии O_2 .

Для идентификации продуктов трансляции изучаемых генов в условиях окислительного стресса был проведен количественный протеомный анализ клеточной культуры штамма *B. infantis* ATCC 15697.

Количественный протеомный анализ антиоксидантного ответа культуры штамма B. infantis ATCC 15697

Для протеомного анализа также использовали растущую культуру штамма *B. infantis* ATCC 15697 в фазе экспоненциального роста, которую подвергали воздействию перекиси водорода в течение двух часов и кислорода в течение двух и четырех часов.

Белки выделяли из культуральных клеток, отобранных до (контроль) и после воздействия окислительного стресса, и изучали с помощью количественного протеомного анализа, описанного в разделе “Материалы и методы”. Volcano plot для белков *B. infantis* ATCC 15697 на рис. 1 показывает количество белков с выявленной разницей (увеличение или снижение) после действия окислительного стресса. Под действием H_2O_2 разница обнаруживается для двух белков, под действием O_2 в течение двух часов разница обнаруживается для шести белков и под действием O_2 в течение четырех часов разница обнаруживается для 63 белков. В дальнейшем анализ были включены только данные по увеличению количества белка более чем в 2 раза.

Таблица 1. Изменения уровней транскриптов генов, кодирующих продукты антиоксидантного ответа в *B. infantis* ATCC 15697, до и после действия окислительного стресса

Продукт гена	Locus_tag гена	*H ₂ O ₂ /контроль	*O ₂ 2 ч/контроль	*O ₂ 4 ч/контроль
Белок с доменом тиоредоксина	<i>BLON_RS01630</i>	2.66	1.06	1.79
Тиоредоксинредуктаза	<i>BLON_RS12925</i>	9.27	1.41	2.13
АТФаза Р-типа	<i>BLON_RS01320</i>	19.92	2.05	3.68
Изомераза линолевой кислоты	<i>BLON_RS04150</i>	5.31	1.47	0.79
Пиридиннуклеотид-дисульфидоксидоредуктаза класса 1	<i>BLON_RS08540</i>	0.83	2.4	1.71
Fe-пермеаза	<i>BLON_RS01040</i>	0.45	2.57	2.54

* — кратное отношение к содержанию в разных образцах до и после окислительного стресса.

Пять известных белков с АО функционально-стью были идентифицированы в ответ на стресс (табл. 2). Повышенный уровень наблюдался у глутаредоксина (в 3.55 раз) только под действием кислорода в течение четырех часов инкубации. Однако уровень транскриптов гена, его кодирующего, был на низком уровне. АТФаза Р-типа и ферритин увеличивались после действия всех стрессовых факторов, как и их транскрипты (табл. 1 и 2). Количество Fe-пермеазы и субъединицы PdxT пиридоксаль-5'-фосфат синтазы увеличивается только при действии кислорода в 30.5 раз (2 ч), 24.7 раз (4 ч) и 3.3 раз (4 ч) соответственно.

Остальные 34 идентифицированных белка с повышенным уровнем в клетках после действия окислительного стресса выполняют различные функции, но в основном защитные.

При действии H₂O₂ было выявлено увеличение только для helix-turn-helix регулятора транскрипции в 5.26 раз, как и транскрипта в 9.6 раз; внеклеточных белков, связывающих растворенные вещества из семейства 1, в 4.35 раз с увеличением в уровне транскрипта в 21.44 раз, и из семейства 5 в 9.09 раз без выявленного увеличения транскриптов и одного белка с неизвестными функциями с увеличением в 25 раз и увеличением транскрипта в 30.15 раз. Действие O₂ в течение двух часов спровоцировало увеличение только одного белка с неизвестными функциями в 14.58 раза и увеличение транскрипта в 2.3 раза. Остальные белки увеличивались в уровне более чем 2 раза после длительного действия кислорода. Однако для большинства из них наблюдался низкий уровень транскрипции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из немногочисленных опубликованных данных для бифидобактерий были отобраны ферменты и другие соединения с АО действием и кодирующие их гены [5]. Был проведен поиск выявленных к ним ортологов в геномах штаммов подвида *B. longum* subsp. *infantis*. Изучение распре-

деления АО генов показало присутствие 17 в большинстве геномов, что указывает на их консервативность и, возможно, общие механизмы АО защиты у *B. longum* subsp. *infantis*. Однако у бифидобактерий была выявлена штаммоспецифичность в проявлении АО способности [5]. Возможно, в защите от окислительного стресса у бифидобактерий участвуют и другие неизвестные ферменты и метаболиты. Для определения функциональности выявленных в геномах АО генов и выявления новых генов, участвующих в ответе на окислительный стресс, мы применили комплексный подход с использованием омиксных технологий. Анализ общего транскриптома показал увеличение уровней транскриптов для шести генов, кодирующих известные АО белки. После действия всех окислительных факторов у *B. infantis* ATCC 15697 определен высокий уровень транскриптов гена, кодирующего АТФазу Р-типа. Сообщалось, что ген *zntA1*, кодирующий АТФазу Р-типа, был повышен в 2.01 раза после 60 мин воздействия кислорода у штамма *B. longum* BVMN68 [26]. АТФазы Р-типа могут быть вовлечены в перенос Mn²⁺, который затем удаляет супероксидные анионы в клетках бифидобактерий [12]. Mn²⁺ не только заменяет супероксиддисмутазу в удалении супероксидных анионов, но также может удалять H₂O₂ [27]. После действия H₂O₂ и O₂ повышается уровень тиоредоксинредуктазы и белка с доменом тиоредоксина. Гены, кодирующие глутаредоксин, тиоредоксин и тиоредоксинредуктазу, были повышены более чем в 6 раз за 60 мин при воздействии кислорода на штамм *B. longum* BVMN68 [26]. Тиоредоксин-зависимая восстановительная система играет важную роль в реакции на окислительный стресс путем непосредственного восстановления H₂O₂, удаления гидроксильных радикалов, подавления синглетного кислорода и поддержания внутриклеточного тиолдисульфидного баланса [28]. Действие кислорода оказало влияние на повышение уровня Fe-пермеазы. Fe-пермеазы в составе плазматической мем-

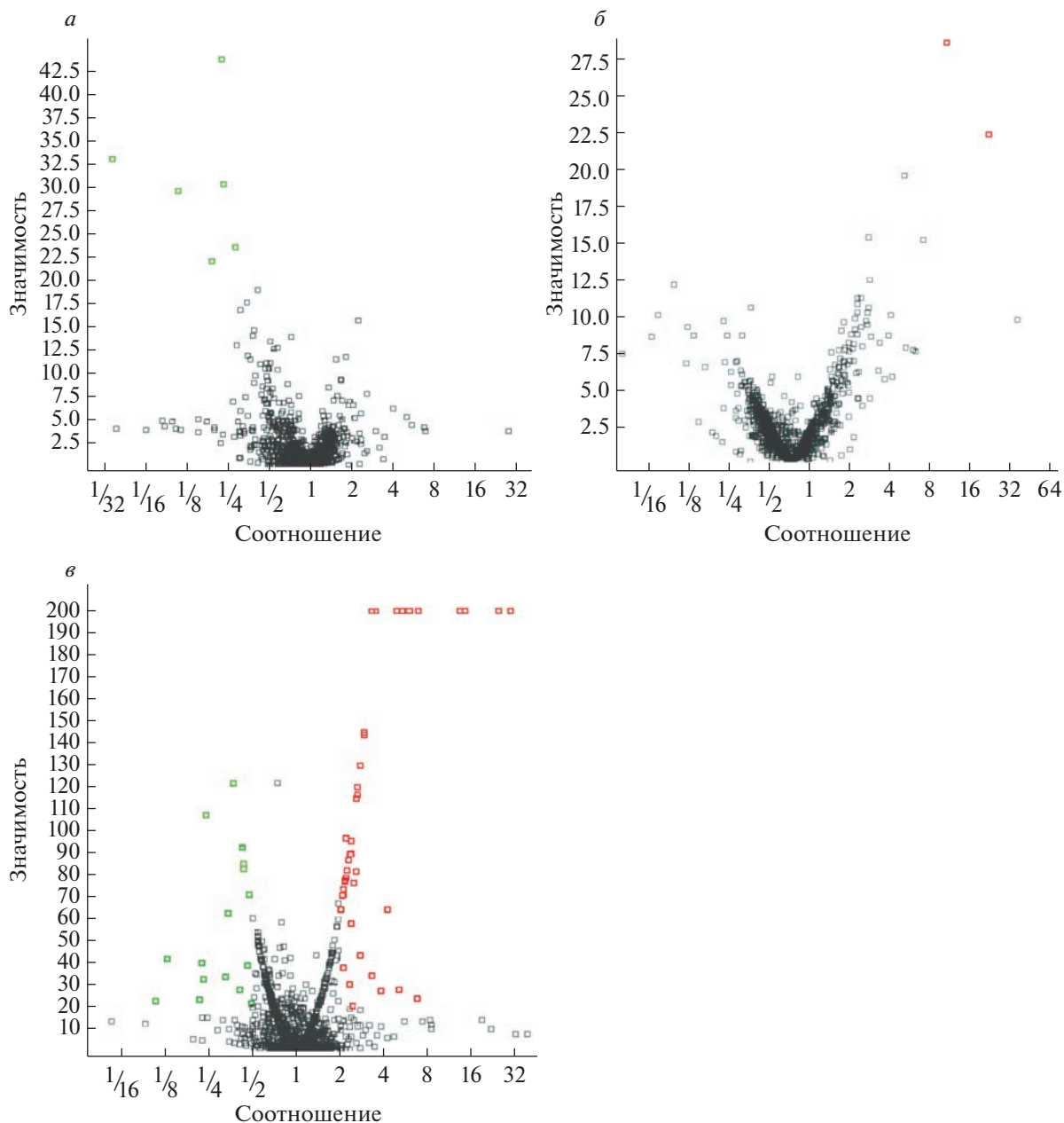


Рис. 1. Volcano plot для белков *B. infantis* ATCC 15697, индуцируемых действием: а – H_2O_2 , б – O_2 в течение 2-часовой инкубации, в – O_2 в течение 4-часовой инкубации.

браны участвуют в переносе железа [29]. Значительное повышение уровня транскрипта гена, кодирующего изомеразу линолевой кислоты, было отмечено только после действия перекиси водорода. Конъюгированная линолевая кислота, образуемая некоторыми видами бифидобактерий, сама не обладает АО свойствами, однако ее метаболиты проявляют способность защищать клетки от вредного окислительного воздействия [30, 31]. После действия кислорода в клетках *B. infantis* ATCC 15697 был отмечен повышенный уровень транскрипта гена пиридиннуклеотид-дисуль-

фидоксидоредуктазы класса 1. Известно, что этот фермент участвует в реакции клеток на окислительный стресс [11].

Количественный протеомный анализ позволил выявить и другие белки с АО функциями. После действия H_2O_2 возросло количество ферритина в 4.54 раз. Ферритин катализирует окисление ионов Fe^{2+} перекисью водорода, что предотвращает образование гидроксильного радикала по реакции Фентона [12]. На уровне трансляции так же, как и на уровне транскрипции, увеличивается

Таблица 2. Сравнительные данные протеомного и транскриптомного анализа клеток штамма *B. infantis* ATCC 15697 до и после воздействия окислительного стресса

Продукт гена	Locus_tag гена	H ₂ O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 4 ч/контроль
Антиоксидантный ответ				
Глутаредоксин	BLON_RS12860	NS	NS	3.55*
		0.49	1.55	1.05**
Ферритин	BLON_RS00160	4.54	NS	5.88
		21.61	1.70	3.57
Fe-пермеаза	BLON_RS01040	NS	30.50	24.70
		0.45	2.57	2.54
АТФаза Р-типа	BLON_RS01320	3.57	NS	2.10
		19.92	2.05	3.68
Пиридоксаль-5'-фосфатсинтаза субъединица <i>pdxT</i>	BLON_RS10350	NS	NS	3.30
		0.81	2.36	3.17
Ответ на стресс				
Внеклеточный лиганд- связывающий рецептор	BLON_RS02930	NS	NS	3.49
		0.35	1.0	1.58
Внеклеточный лиганд- связывающий рецептор	BLON_RS03810	NS	NS	2.18
		1.33	2.83	2.0
RelB-антитоксин	BLON_RS01740	NS	NS	2.98
		2.5	0.82	1.0
Фактор созревания рибосом <i>rimM</i>	BLON_RS01970	NS	NS	2.68
		0.66	1.0	1.27
Фактор элонгации транскрипции <i>greA</i>	BLON_RS09225	NS	NS	2.62
		1.68	1.95	2.3
Белок, содержащий домен FMN	BLON_RS01070	NS	NS	2.39
		1.56	1.0	0.36
Домен DnaJ белка теплового шока	BLON_RS00750	NS	NS	2.29
		10.3	0.8	4.2
Тирозин-тРНК-лигаза	BLON_RS09710	NS	NS	2.27
		0.91	0.57	0.54
Белок-шаперон ClpB	BLON_RS12265	NS	NS	2.18
		21.57	1.58	8.1
Эндорибонуклеаза L-PSP	BLON_RS01645	NS	NS	2.64
		0.59	1.75	2.5
Метаболизм аминокислот				
Альфа-субъединица триптофан- синтазы	BLON_RS07130	NS	NS	2.19
		0.63	2.1	2.0
Антранилатфосфорибозилтранс- фераза	BLON_RS04830	NS	NS	2.13
		0.79	2.03	3.41

Таблица 2. Продолжение

Продукт гена	Locus_tag гена	H ₂ O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 4 ч/контроль
3-Изопропилмалат дегидрогеназа	<i>BLON_RS10735</i>	NS 0.57	NS 1.92	2.04 2.63
Треонинальдолаза	<i>BLON_RS10060</i>	NS 0.42	NS 0.46	2.02 0.38
Метаболизм нуклеотидов				
Нуклеозид 2-дезоксирибозил-трансфераза	<i>BLON_RS03085</i>	NS 0.47	NS 1.1	2.22 1.65
Фосфорибозиламинглицинлигаза	<i>BLON_RS10180</i>	NS 1.5	NS 0.85	2.77 0.33
Регуляция транскрипции				
helix-turn-helix регулятор транскрипции	<i>BLON_RS04795</i>	5.26 9.6	NS 1.84	6.95 1.0
Транспорт				
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 1)	<i>BLON_RS12635</i>	4.35 21.44	NS 0.44	2.80 0.44
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 1)	<i>BLON_RS10690</i>	NS 0.58	NS 1.16	3.33 1.16
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 5)	<i>BLON_RS01440</i>	9.09 0.9	NS 1.25	NS 0.92
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 5)	<i>BLON_RS10445</i>	NS 1.55	NS 2	6.91 0.86
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 5)	<i>BLON_RS04415</i>	NS 0.5	NS 1.96	2.10 2.0
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 3)	<i>BLON_RS03845</i>	NS 1.12	NS 0.82	2.96 0.82
УДФ-N-ацетилглюкозамин-N-ацетил-мурамил(пентапептид)-пирофосфорил-ундекапренол-N-ацетилглюкозаминтрансфераза	<i>BLON_RS04355</i>	NS 0.93	NS 1.14	6.03 0.83
SecE-субъединица транслоказы	<i>BLON_RS06530</i>	NS 0.6	NS 0.6	2.48 0.46
ABC-2-транспортёр	<i>BLON_RS12655</i>	NS 6.17	NS 1.57	2.36 1.02
ABC-транспортёр	<i>BLON_RS01065</i>	NS 1.19	NS 1.25	3.84 0.47

Таблица 2. Окончание

Продукт гена	Locus_tag гена	H ₂ O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 4 ч/контроль
Белок, содержащий домен Fsx	<i>BLON_RS01060</i>	NS 0.9	NS 1.25	2.47 0.63
Неизвестные белки				
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS01045</i>	NS 0.65	14.58 2.3	14.56 1.38
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS10130</i>	25.0 30.15	NS 1.5	NS 0.75
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS11705</i>	NS 0.65	NS 0.54	13.33 0.27
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS01055</i>	NS 0.77	NS 1.55	5.49 0.96
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS12535</i>	NS 0.8	NS 1.66	2.39 3.14
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS07940</i>	NS 2.1	NS 1.46	2.33 2.5

Примечание. * – кратное отношение к среднему содержанию белков в различных образцах до и после окислительного стресса; ** – кратное отношение к количеству транскриптов в различных образцах до и после окислительного стресса. NS – без изменений в уровнях.

АТФаза Р-типа при действии всех стрессовых факторов, что указывает на важную роль белка для защиты от окислительного стресса у *B. infantis*. Важно отметить значительное повышение АО белков Fe-пермеазы, пиридоксаль-5'-фосфат-синтазы (субъединицы PdxT) и глутаредоксина при длительном воздействии кислорода. Пиридоксаль-5'-фосфатсинтаза участвует в синтезе витамина B6. Витамин B6 играет важную роль в антиоксидантном механизме и является кофактором глутатиона [32]. Глутаредоксин действует как антиоксидант, восстанавливая дегидрокарбонат, пероксиредоксины, метионинсульфоксидредуктазу [33]. Отсутствие повышенных уровней АО белков, выявленных при транскриптомном анализе, можно объяснить их нестабильностью. Возможно, они быстро разрушаются и их сложно зафиксировать используемым методом анализа [34].

Другие идентифицированные белки с повышенным уровнем в клетках участвуют в процессах реакции на стресс, метаболизме аминокислот и нуклеотидов и транспортных процессах. У штамма *B. infantis* ATCC 15697 в основном после длительного воздействия кислорода повышается уровень стрессовых белков шаперона ClpB и белка теплового шока с DnaJ доменом. Транскрипты генов, кодирующих шапероны DnaJ и ClpB, были повышены в штамме *B. longum* VBMN68 после 60-минутного воздействия кислорода [26]. ClpB сов-

местно с DnaK, DnaJ и GrpE участвует в подавлении агрегации белка. Это универсальное явление, обнаруживаемое в реакциях различных организмов на различные абиотические стрессовые состояния [35]. Участие ClpB в антиоксидантной активности предполагается у штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21, обладающего высоким антиоксидантным потенциалом в модели паркинсонизма [36]. В клетках штамма *B. infantis* ATCC 15697 также был выявлен избыточный уровень для RelB-антитоксина, белка с FMN доменом, тирозин-гРНК-лигазы, эндорибонуклеазы L-PSP. RelB-антиоксин нейтрализует действие токсина, образуемого при стрессовых состояниях клетки [37]. Тирозин-гРНК-лигаза образует углерод-кислородные связи. Эндорибонуклеаза L-PSP расщепляет РНК в клетке. FMN домен был обнаружен в общих стрессовых белках [38]. Он может помогать бактериям реагировать на окислительный стресс. Таким образом, эти белки могут играть важную роль в защите бифидобактерий от окислительного стресса.

Под длительным действием кислорода повышались уровни белков, участвующих в метаболизме нуклеотидов и в метаболизме и транспорте аминокислот. Гены, принадлежащие к категории COG E (транспорт и метаболизм аминокислот), были индуцированы по сравнению с контролем в штамме *B. longum* VBMN68 при воздействии кислорода [26], что указывает на то, что процессы

биосинтеза аминокислот и белков, транспорта и метаболизма усиливаются при окислительном стрессе. В штамме *B. infantis* ATCC 15697 в основном при продолжительном культивировании на качалке повышается уровень у 11 различных белков с транспортными функциями. Активность транспортной системы включается в ответ на потребности клеток как в соединениях с антиоксидантными свойствами, так и в источниках дополнительной энергии, необходимой для восстановления внутриклеточного баланса.

В клетках *B. infantis* ATCC 15697 после длительного воздействия кислорода увеличивался уровень шести белков с неизвестными функциями, что указывает на использование клетками неизвестных механизмов защиты от окислительного стресса. Эти белки представляют большой интерес для дальнейших исследований.

Таким образом, можно заключить, что механизм антиоксидантной защиты у исследуемого штамма включает как известные механизмы, характерные для бактерий вида *B. longum*, а именно синтез АО-ферментов, соединений с АО свойствами, хелатирование токсичных ионов (Fe^{2+}), так и специфические механизмы, включая как внутриклеточные механизмы общей антистрессовой защиты, так и неизвестные пути, в которые возможно вовлечены белки с неизвестными функциями.

Изучение роли отобранных штаммов бифидобактерий в обеспечении формирования противовоспалительного потенциала микробиоты и организма хозяина — несомненно перспективное направление исследований [4].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-54-18006. Участие В.Н. Даниленко и О.В. Авериной также финансировалось в рамках гос. задания № 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. Wong C.B., Odumaki T., Xiao J.Z. Insights into the reason of Human-Residential Bifidobacteria (HRB) being the natural inhabitants of the human gut and their potential health promoting benefits // *FEMS Microbiol. Rev.* 2020. V. 44. P. 369–385. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa010>
2. Arbolea S., Watkins C., Stanton C., Ross R.P. Gut bifidobacteria populations in human health and aging // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. e1204. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01204>
3. Averina O.V., Zorkina Y.A., Yunes R.A. et al. Bacterial metabolites of human gut microbiota correlating with depression // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 23. 9234. <https://doi.org/10.3390/ijms21239234>
4. 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>
5. 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. P. 1340. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101340>
6. Domej W., Oetll K., Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD—Implications and relevance for treatment // *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 2014. V. 9. P. 1207–1224. <https://doi.org/10.2147/COPD.S51226>
7. Calabrese V., Santoro A., Monti D. et al. Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. V. 115. P. 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.379>
8. Kawasaki S., Watanabe M., Fukiya S., Yokota A. Stress responses of bifidobacteria: oxygen and bile acid as the stressors. The bifidobacteria and related organisms // *Biol. Taxon. Appl.* 2018. V. 10. P. 131–143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805060-6.00007-7>
9. Shimamura S., Abe F., Ishibashi N. et al. Between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species // *J. Dairy Sci.* 1992. V. 75. № 12. P. 3296–3306. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78105-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78105-3)
10. Huang G., Pan H., Zhu Z., Li Q. The complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* LTBL16, a potential probiotic strain from healthy centenarians with strong antioxidant activity // *Genome.* 2020. V. 112. P. 769–773. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.05.015>
11. Xiao M., Xu P., Zhao J. et al. Oxidative stress-related responses of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN68 at the proteomic level after exposure to oxygen // *Microbiology.* 2011. V. 157. P. 1573–1588. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044297-0>
12. Klijn A., Mercenier A., Arigoni F. Lessons from the genomes of bifidobacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. V. 29. P. 491–509. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.010>
13. Blazheva D., Mihaylova D., Averina O.V. et al. Antioxidant potential of probiotics and postbiotics: A biotechnological approach to improving their stability // *J. Gen.* 2022. V. 58. № 9. P. 1036–1050. <https://doi.org/10.1134/S1022795422090058>
14. Wong C., Sugahara H., Odumaki T., Xiao J. Different physiological properties of human-residential and non-human-residential bifidobacteria in human health //

- Benef. Microbes. 2018. V. 9. P. 111–122.
https://doi.org/10.3920/BM2017.0031
15. Sela D.A., Chapman J., Adey A. et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome // PNAS. 2008. V. 105. № 48. P. 18964–18969.
https://doi.org/10.1073/pnas.0809584105
 16. Turroni F., Ventura M., van Sinderen D. Opinion Insights into endogenous *Bifidobacterium* species in the human gut microbiota during adulthood // Trends in Microbiol. 2022. V. 30. № 10. P. 940–947.
https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.04.004
 17. Andrews S., Fast Q.C. A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
 18. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2114–2120.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170
 19. Madden T.L., Tatusov R.L., Zhang J. Applications of network BLAST server // Methods Enzymol. 1996. V. 266. P. 131–141.
https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)66011-x
 20. Buchfink B., Reuter K., Drost H.G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND // Nature Meth. 2021. V. 18. P. 366–368.
https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x
 21. 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
 22. Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools // Gigascience. 2021. V. 10. giab008.
https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008
 23. Putri G.H., Anders S., Pyl P.T. et al. Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0 // Bioinformatics. 2022. btac166.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac166
 24. Kulak N.A., Pichler G., Paron I. et al. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells // Nature Meth. 2014. V. 11. № 3. P. 319–324.
https://doi.org/10.1038/nmeth.2834
 25. Ma B., Zhang K., Hendrie C. et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry // Rapid. Commun. Mass Spectrom. 2003. V. 17. № 20. P. 2337–2342.
https://doi.org/10.1002/rcm.1196
 26. Zuo F., Yu R., Xiao M. et al. Transcriptomic analysis of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN68 in response to oxidative shock // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 17085.
https://doi.org/10.1038/s41598-018-35286-7
 27. Horsburgh M.J., Wharton S.J., Karavolos M., Foster S.J. Manganese: Elemental defence for a life with oxygen // Trends Microbiol. 2002. V. 10. P. 496–501.
https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02462-9
 28. Zeller T., Klug G. Thioredoxins in bacteria: Functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes // Naturwissenschaften. 2006. V. 93. P. 259–266.
https://doi.org/10.1007/s00114-006-0106-1
 29. Koster W. Cytoplasmic membrane iron permease systems in the bacterial cell envelope // Front. Biosci. 2005. V. 1. № 10. P. 462–477.
https://doi.org/10.2741/1542
 30. MacDonald H.B. Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge // J. Am. Coll. Nutr. 2000. V. 19. № 2. P. 1115–1185.
https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718082
 31. Raimondi S., Amaretti A., Leonardi A. et al. Conjugated linoleic acid production by bifidobacteria: screening, kinetic, and composition // Biomed. Res. Int. 2016. 8654317.
https://doi.org/10.1155/2016/8654317
 32. Mayo B., van Sinderen D. Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects / Eds Mayo B., van Sinderen D. Norfolk, UK: Caister Acad. Press, 2010. 260 p.
 33. Fernandes A.P., Holmgren A. Glutaredoxins: Glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system // Antiox. Redox Sign. 2004. V. 6. № 1. P. 63–74.
https://doi.org/10.1089/152308604771978354
 34. Belle A., Tanay A., Bitincka L. et al. Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome // PNAS. 2006. V. 103. № 35. P. 13004–13009.
https://doi.org/10.1073/pnas.0605420103
 35. Zolkiewski M. ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation: A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 28083–28086.
https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28083
 36. 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 фармабиотики // Генетика. 2022. Т. 58. № 9. С. 1029–1041.
https://doi.org/10.31857/S0016675822090120
 37. Averina O.V., Alekseeva M., Shkoporov A., Danilenko V. Functional analysis of the type II toxin–antitoxin systems of the MazEF and RelBE families in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 // Anaerobe. 2015. V. 35. P. 59–67.
https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.07.007
 38. Hilario E., Li Y., Niks D., Fan L. The structure of a *Xanthomonas* general stress protein involved in citrus canker reveals its flavin-binding property // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2012. V. 68. P. 846–853.
https://doi.org/10.1107/S0907444912014126

Таблица S1. Референсный каталог аминокислотных последовательностей, кодируемых генами с антиоксидантными свойствами в бактериях рода *Bifidobacterium*

Название фермента	Число гомологов
Alkyl hydroperoxide reductase <i>ahpC</i>	6
Alkyl hydroperoxide reductase <i>ahpF</i>	6
Class I pyridine nucleotide disulfideoxidoreductase	3
Cobalamin-independent methionine synthase II	9
DSBA oxidoreductase	9
Dihydroorotate dehydrogenase	9
Glutaredoxin <i>grxC2 (nrdH)</i>	7
Glutathione import ATP-binding protein <i>gsiA</i>	8
Hydroxycinnamic acid esterase <i>caeA</i> – Carboxylesterase A	4
Linoleic acid isomerase	5
NADH oxidase	11
Oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase	9
P-type ATPase	9
Peptidase O <i>pepO</i>	9
Permease	5
Peroxiredoxin	5
Polyphosphate kinase <i>ppk</i>	9
Pyrophosphohydrolase <i>mutT1</i>	9
Ribonucleotide reductase <i>nrdA</i>	6
Subtilisin-like serine protease	2
Superoxide dismutase <i>sodB</i>	12
Superoxide dismutase <i>sodC</i>	11
Thioredoxin	4
Thioredoxin domain protein	9
Thioredoxin peroxidase	7
Thioredoxin reductase	14
Thioredoxin reductase-like protein	6

Таблица S2. Распространение генов, кодирующих продукты с антиоксидантной функциональностью, в геномах *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

Штамм	Алкилглицеропероксид- редуктаза <i>ahpC</i>	Алкилглицеропероксид- редуктаза <i>ahpF</i>	Пиридиннуклеотид- дисульфидоксидо- редуктаза класса I	Оксидоредуктаза DSBA	Диглицероперотат- дегидрогеназа	Лутаредоксин <i>grxC2</i>	Лутатинон АТФ-связывающий белок <i>gsiA</i>	Изомеразы линолевой кислоты	NADH-оксидазы	АТФазы Р-типа
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> 157F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 = JCM 1222 = DSM 20088	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> isolate USA001 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain BINF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain BT1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain CECT 7210	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 11347	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 11660	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 7009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 7010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain KCTC 5934	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain NCTC11817	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Таблица S2. Продолжение

Штамм	Пермеаза	Цероликсин	Сериновая протеаза	Белок с ломом тиродоксина	Тиродоксин-пероксидаза	Тиродоксин-редуктаза	Тиродоксин-подобный белок
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> 157F	–	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 = JCM 1222 = DSM 20088	+	+	–	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> isolate USA001 I	+	+	–	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain BINF	+	+	–	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain BT1	+	+	–	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain CECT 7210	–	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 11347	+	+	–	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 11660	–	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 7009	+	+	–	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 7010	+	+	–	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain KCTC 5934	–	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain NCTC 11817	+	+	–	+	+	+	+

Таблица S3. Параметры анализируемых транскриптомных образцов

Название образца	До тримминга		После тримминга	
	размер, млн чтений	размер, млрд нуклеотидов	размер, млн чтений	размер, млрд нуклеотидов
BIN1	30.4	3.1	29.0	2.6
BIN2	30.6	3.1	29.1	2.6
BIN3	30.5	3.1	29.2	2.6
BIN4	30.5	3.1	29.2	2.6
BIN5	28.2	2.8	27.1	2.4

Примечание. BIN1 – контроль 1, BIN2 – контроль 2, BIN3 – H₂O₂ – 2 ч, BIN4 – O₂ – 2 ч, BIN5 – O₂ – 4 ч.

Reaction of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Strain ATCC 15697 to Oxidative Stress

O. V. Averina^a, *, A. S. Kovtun^a, D. A. Mavletova^a, R. H. Ziganshin^b, and V. N. Danilenko^a

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

^bShemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: olgavr06@mail.ru

The genus *Bifidobacterium* is one of the predominant bacterial populations in human gut microbiota. Despite the increasing number of studies on the beneficial functionality of bifidobacteria for human health, knowledge about their antioxidant potential is still insufficient. The role of the antioxidant potential of bifidobacteria in maintaining the homeostasis of the intestinal microbiota of the host organism as a whole is an important task that requires solutions. For the first time, this paper presents the data of genomic, transcriptomic and proteomic analyses of probiotic strains *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 after the action of oxidative stress. The growing culture of strain was exposed to hydrogen peroxide for 2 hours and oxygen for 2 and 4 hours. Preliminary genome analysis of the strain showed the presence of 18 genes encoding a known protein with antioxidant function, as in other compiled genomes of *B. longum* subsp. *infantis* strains available in the international database. The complete transcriptome analysis revealed an increase in transcript levels by more than two times for 6 genes with a known antioxidant function. The data of quantitative proteomic analysis showed an increase in protein levels by more than two times for five enzymes with a known antioxidant function. 28 other proteins with increased levels more than twice were identified in the cells of the growing culture in response to the long action of oxygen. These proteins can be involved in the processes of the cell's response to stress, the amino acids, nucleotides metabolism and transport processes. Six proteins with unknown functions, which may play a significant role in the antioxidant response of anaerobic bifidobacteria, were found to have high levels in the cells after the action of stress. The obtained data are supposed to be used in the selection of *B. longum* subsp. *infantis* strains and the creation of probiotics able to correct the composition of the microbiota.

Keywords: bifidobacteria, genomic analysis, transcriptomic analysis, proteomic analysis, oxidative stress.