

На правах рукописи

Дьячкова Марина Сергеевна

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ЭВОЛЮЦИОННЫЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
ГЕНОВ КЛАСТЕРА PFNA У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BIFIDOBACTERIUM***

специальность 03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,
ДАНИЛЕНКО Валерий Николаевич,
заведующий лабораторией генетики микроорганизмов
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук, г. Москва

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
СИНЕОКИЙ Сергей Павлович, директор
Национального биоресурсного центра — Всероссийская
коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ
ВКПМ), Федерального государственного бюджетного
учреждения «Государственный научно-исследовательский
институт генетики и селекции промышленных
микроорганизмов Национального исследовательского
центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский
институт» - ГосНИИГенетика), г. Москва

кандидат биологических наук,
ОЛЕХНОВИЧ Евгений Иванович, научный сотрудник
лаборатории биоинформатики Федерального
государственного бюджетного учреждения «Федеральный
научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального Медико-биологического Агентства», г.
Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г.
Новосибирск

Защита состоится « » _____ в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан « » _____ 2019 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Горячева И.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и разработанность темы исследования:

Бифидобактерии являются анаэробами и считаются одними из самых древних представителей актинобактерий, существовавшими во времена низкого содержания кислорода в атмосфере Земли. В процессе колонизации новой анаэробной ниши бифидобактерии смогли эффективно приспособиться к обитанию в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) хозяина за счет утилизации гликанов мукоидного слоя кишечного эпителия. В настоящее время бифидобактерии входят в состав облигатной комменсальной микробиоты человека и других животных, включая насекомых, птиц и млекопитающих. Современные представления об экологии бифидобактерий предполагают строгую ассоциацию между видами бифидобактерий и занимаемыми экологическими нишами в организмах хозяев, что обеспечивается, вероятно, длительной коэволюцией и особыми механизмами видоспецифической адаптации, которые на сегодняшний день изучены весьма слабо.

Среди анаэробных комменсальных микроорганизмов микробиоты человека бифидобактерии являются наиболее ранними колонизаторами. Являясь доминирующей компонентой комменсальной микробиоты младенцев, бифидобактерии способствуют становлению иммунной системы человека на ранних этапах постнатального развития. Бифидобактерии как компонент комменсальной микробиоты оказывают положительный эффект на здоровье человека и поддерживают нормальное функционирование организма хозяина. Ключевыми факторами в этом процессе, по-видимому, являются адгезионные антагонистические свойства представителей рода *Bifidobacterium*, а также способность осуществлять коммуникацию с иммунной системой, стимулируя выработку как противовоспалительных, так и провоспалительных цитокинов и других факторов иммунного ответа. Однако механизмы, обеспечивающие выживание бифидобактерий в условиях воспалительного процесса и постоянство репертуара нормальной микробиоты кишечника, остаются малоизученными.

Ранее в геномах бифидобактерий обнаружены и охарактеризованы шесть СТПК, среди которых наибольший интерес представляет видоспецифическая СТПК Rkb2, демонстрирующая аномально высокий уровень дивергенции последовательностей различных видов по сравнению с другими охарактеризованными СТПК. Анализ субстратов фосфорилирования позволил выдвинуть предположение, что функции СТПК Rkb2 могут быть связаны с адгезией и коммуникацией бифидобактерий с эпителиальными клетками кишечника. Высокий уровень межвидовой дивергенции последовательностей генов может быть следствием воздействия положительного естественного отбора, направленного на

сохранение мутаций, приводящих к изменению структуры кодируемых белков, и обеспечивающего быструю молекулярную эволюцию генов. Быстрая эволюция и положительный отбор нередко затрагивают гены, вовлеченные в коммуникацию с факторами внешней среды, и особенно, биотическими экологическими факторами.

Объектом изучения данной диссертационной работы является ген *pkb2*, кодирующий видоспецифическую СТПК Pkb2 в геномах различных видов бифидобактерий, а также его генетическое окружение. Ранее было показано, что генетическое окружение гена *pkb2* достаточно консервативно. Генетическое окружение гена *pkb2* включает в себя группу генов, совместно обнаруживаемых в геномах представителей различных видов рода *Bifidobacterium*: гены *pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58* и *tgm*. Кластер генов получил название PFNA (*pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*). Гены кластера PFNA предположительно являются одной из систем, обеспечивающих коммуникацию бифидобактерий с факторами занимаемой экологической ниши, поэтому исследование их функциональной активности и особенностей эволюции является важной ступенью в понимании не только процессов адаптации и взаимодействия с организмом хозяина, но и их значения в поддержании здоровья и гомеостаза организма человека и других носителей в целом.

Цель исследования:

Целью настоящей работы является функциональная характеристика и анализ молекулярной эволюции генов кластера PFNA у представителей различных видов рода *Bifidobacterium*.

Задачи исследования:

1. Структурно-функциональная характеристика генов кластера PFNA (*pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58* и *tgm*) в геномах представителей различных видов рода *Bifidobacterium*.
2. Изучение транскрипционной организации кластера генов PFNA в геноме *B. longum* subsp. *longum* GT15.
3. Анализ молекулярной эволюции последовательностей генов кластера PFNA в геномах представителей различных видов рода *Bifidobacterium*.
4. Анализ уровня экспрессии гена *fn3* в геномах представителей различных видов рода *Bifidobacterium*.

5. Изучение функциональной активности и субстратной специфичности полноразмерных СТПК Pkb2 штаммов *B. longum* subsp. *longum* GT15 и *B. choerinum* DSM 20434.

6. Изучение влияния провоспалительного цитокина IL-6 на рост культуры и экспрессию генов штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15.

Научная новизна и практическая значимость исследования:

В рамках диссертационной работы впервые была определена полногеномная последовательность штамма *B. angulatum* GT 102 в статусе «complete». Сборка генома в статусе «complete» имеет практическую значимость, так как обеспечивает формирование референсной последовательности для полногеномного секвенирования и сборки геномов новых штаммов вида *B. angulatum* и близкородственных видов бифидобактерий.

Впервые было дано объяснение феномену быстрой эволюции и высокой степени межвидовой дивергенции последовательностей генов кластера PFNA бифидобактерий, что расширяет представления о роли положительного отбора в молекулярной эволюции генов, вовлеченных в коммуникацию с факторами занимаемой экологической ниши в организме хозяина. Сайты, на которые осуществляется давление отбора, впервые были локализованы в первичной структуре белков, кодируемых генами кластера. Полученные данные могут быть использованы для расширения структурно-функциональной аннотации данных белков.

Впервые была изучена экспериментально и *in silico* транскрипционная организация кластера PFNA в геноме *B. longum* subsp. *longum* GT15. В результате анализа было установлено, что гены *pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58*, *tgm*, *prpC*, *fha* и ген BLGT_RS02790 в геноме *B. longum* subsp. *longum* GT15 транскрибируются в составе единого оперона, а также были определены точки старта и терминации транскрипции.

Впервые была проведена оценка влияния IL-6 как фактора иммунного ответа на рост культуры и экспрессию генов штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15. Полученные данные могут быть использованы для изучения генов и генных сетей, участвующих во взаимодействии с иммунной системой организма хозяина.

Впервые была изучена видоспецифичность киназно-субстратного взаимодействия на примере штаммов *B. longum* subsp. *longum* GT15 и *B. choerinum* DSM 20434 в ходе киназной реакции. В результате анализа впервые экспериментально была показана функциональная активность полноразмерных СТПК Pkb2 представителей видов *B. longum* subsp. *longum* и *B. choerinum*, субстратная видоспецифичность для СТПК Pkb2 *B. longum* subsp. *longum* GT15 и ее отсутствие для СТПК Pkb2 *B. choerinum* DSM 20434.

Положения, выносимые на защиту:

1. Гены кластера PFNA (*pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58* и *tgm*) представляют собой эволюционно стабильную группу функционально связанных генов, обнаруживаемых совместно в геномах представителей различных видов рода *Bifidobacterium*, и транскрибируются в составе единого оперона.

2. Высокий уровень межвидовой дивергенции нуклеотидных последовательностей генов кластера PFNA обусловлен событиями продолжительного и эпизодического положительного отбора, провоцирующих быструю молекулярную эволюцию генов.

3. Быстрая эволюция последовательностей генов *pkb2* и *aaa-atp* обуславливает видоспецифичность киназно-субстратного взаимодействия у *B. longum* subsp. *longum* GT15.

Личный вклад автора:

Все основные результаты были получены лично автором, либо при его участии в планировании и проведении экспериментов. Часть экспериментов была проведена совместно с сотрудниками лаборатории Генетики микроорганизмов ИОГен им. Н. И. Вавилова РАН. В частности, эксперимент по оценке влияния провоспалительного цитокина IL-6 как фактора иммунного ответа на скорость роста культуры и экспрессию генов штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15 был проведен совместно с к.б.н. Климиной К. М. Эксперимент по изучению видоспецифичности киназно-субстратного взаимодействия на примере штаммов *B. longum* subsp. *longum* GT15 и *B. choerinum* DSM 20434 в ходе киназной реакции был проведен совместно с к. б. н. Мавлетовой Д. А. и к. б. н. Алексеевой М. Г. на базе Лаборатории изотопных методов ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Степень достоверности и апробация результатов:

Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Используемые методы соответствуют поставленным задачам. Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ФГБУН ИОГен РАН в 2014-2018 г. Автором опубликовано 4 статьи по теме диссертации в научных рецензируемых изданиях, индексируемых в базе данных Scopus и отвечающих требованиям Высшей Аттестационной Комиссии Министерства образования и науки Российской Федерации, а также 2 статьи в сборниках материалов конференций. Промежуточные и итоговые результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях. Устный доклад был представлен на II Объединенном научном форуме (Сочи-Дагомыс, Россия, 2019). Стендовые доклады были представлены на 7-м международном съезде ПНМС (Килларни, Ирландия,

2018) и 43-м международном конгрессе FEBS Congress (Прага, Чехия, 2018). Изложенные в диссертационном исследовании положения и выводы являются достоверными. Апробация диссертационной работы проведена на межлабораторном семинаре ИОГен РАН (протокол №15 от 29 октября 2018 г.).

Структура и объем диссертационной работы:

Диссертация включает в себя следующие главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, включая 14 страниц Приложений, содержит 30 рисунков и 19 таблиц. Список цитируемых литературных источников включает 179 наименований, из которых 177 – на английском языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В диссертационной работе глава «Обзор литературы» состоит из 4 разделов. Первый раздел посвящен характеристике бифидобактерий как важного компонента кишечной микробиоты человека. Во втором разделе представлена общая характеристика рода *Bifidobacterium*. Третий раздел описывает молекулярные механизмы, обеспечивающие коммуникацию представителей микробиоты с факторами занимаемой экологической ниши, представленной организмом хозяина. В четвертом разделе содержится информация о быстрой молекулярной эволюции генов как инструменте адаптации организмов к занимаемой экологической нише.

Материалы и методы

Биоинформатические методы:

Основные результаты работы были получены с использованием баз данных GenBank и RefSeq (NCBI) и программ OrthoFinder (v.1.1.8), ClustalW в составе программного обеспечения MEGA (v.7.0.14), Gblocks (v.0.91b), PartitionFinder (v.1.1.1), RAxML (v.8.2.7), codeml в составе пакета PAML (v.4.8), MEME в составе пакета HyPhy (v.2.2.4). Реализацию авторских скриптов проводили в программной среде R (v.3.4.0).

Экспериментальные методы:

Основные результаты работы были получены с использованием перечисленных ниже наборов реагентов. Условия проведения экспериментов соответствовали стандартным протоколам производителей наборов реагентов, а также стандартным протоколам методик, опубликованным в литературных источниках.

В работе были использованы следующие штаммы бифидобактерий из коллекции Лаборатории генетики микроорганизмов: *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527, *B. choerinum* DSM 20434, *B. pseudolongum* subsp. *globosum* DSM 20092, *B. angulatum* GT102, *B. breve* DSM 20213, *B. longum* subsp. *longum* GT15, *B. thermophilum* DSM 20210, *B. ruminantium* AC1786, *B. dentium* Bifido 9. В работе были использованы штаммы *E. coli* DH5 α (Promega) и *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen). Культивирование проводили на твердых средах LB Agar (Sigma-Aldrich, США) и Lactobacillus MRS Agar (HiMedia, Индия), а также в жидких средах LB Broth (Sigma-Aldrich, США), Bifidobacterium Broth и Lactobacillus MRS Broth (HiMedia, Индия).

Выделение и очистку геномной ДНК проводили с использованием наборов реагентов GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, США), Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Выделение и очистку тотальной РНК проводили с использованием наборов реагентов RNA Protect Bacteria Reagent (QIAGEN, США), RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США), RNase-Free DNase Set (QIAGEN, США), TURBO DNA-free Kit (Invitrogen, США), Qubit RNA HS Assay Kit, Ribo-Zero Bacteria rRNA Removal Kit набора ScriptSeq Complete Kit (Bacteria) (Epicentre, США), Agencourt RNA Clean XP (Beckman Coulter, США).

Получение кДНК в ходе реакции обратной транскрипции проводили с использованием наборов реагентов SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, США), Qubit ssDNA HS Assay Kit.

Аmplификацию ДНК и очистку продуктов ПЦР проводили с использованием наборов реагентов «Аmplификация» (Dialat Ltd., Москва, Россия), FastStart High Fidelity PCR System (Sigma-Aldrich, США), 2.5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии Eva Green и ROX (СИНТОЛ, Россия), Mint RACE cDNA amplification set (Евроген, Россия), QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, США), QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, США). Визуализацию продуктов ПЦР проводили в 0,8-2% агарозном геле в трис-ацетатном буфере (ТАЕ) с использованием маркеров молекулярного веса Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва) и Lambda DNA/EcoRI plus HindIII (Thermo Fisher Scientific, США).

Клонирование и экспрессию генов проводили с использованием плазмидных векторов pET32a и pET16b (Novagen, Германия). Рестрикцию и лигирование проводили с использованием ферментов BamHI, HindIII, NdeI и T4 ДНК-лигазы (Promega, США). Выделение и очистку белков проводили с использованием набора Ni-NTA Fast StartKit (Qiagen, США). Визуализацию белков проводили в ПААГ с использованием маркера молекулярного веса Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, Литва).

Подготовку библиотеки кДНК проводили с использованием наборов ScriptSeq Complete Kit (Bacteria) (Illumina, США), Agencourt AMPure XP System (Beckman Coulter, США), RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, США).

Результаты и обсуждение

Биоинформатический анализ генетического окружения гена *pkb2* в геномах представителей различных видов рода *Bifidobacterium*

Генетическое окружение гена *pkb2* было изучено с помощью анализа филогенетических профилей групп ортологичных белков бифидобактерий *in silico*. Принципиальная схема анализа представлена на рис. 1.



Рисунок 1. Принципиальная схема анализа филогенетических профилей групп ортологичных белков бифидобактерий.

В результате анализа мы установили, что генетическое окружение гена *pkb2* включает в себя эволюционно стабильную группу генов, совместно обнаруживаемых в геномах представителей различных видов рода *Bifidobacterium*: гены *pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58* и *tgm*. Кластер генов получил название PFNA (*pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*). Данные гены кодируют СТПК Pkb2 (*pkb2*); протяженный белок FN3, в структуре которого аннотированы FNIII домены, содержащие мотивы, характерные для цитокиновых рецепторов (*fn3*); предполагаемую MoxR АТФазу AAA-АТР (*aaa-atp*); белок Duf58 с неизвестной функцией, в структуре которого аннотирован домен DUF58 (*duf58*), а также предполагаемую трансглутаминазу Tgm (*tgm*). Гены кластера имеют общее направление транскрипции и являются, по-видимому, функциональными партнерами. На основе проведенной биоинформатической характеристики кодируемых белков и анализа литературных данных мы предполагаем, что гены кластера PFNA участвуют в реализации механизмов, обеспечивающих коммуникацию бифидобактерий с факторами занимаемой экологической ниши, представленной организмом хозяина. Мы показали, что гены в составе кластера PFNA, подобно *pkb2*, обладают высоким уровнем межвидовой дивергенции последовательностей, что может указывать на видоспецифичность выполняемых функций. На основе анализа филогенетических профилей групп ортологичных белков, кодируемых генами кластера PFNA, была проведена

реконструкция эволюционных событий потери генов в различных ветвях и кладах филогенетического дерева *Bifidobacterium* и определены предполагаемые механизмы компенсации функции.

Изучение транскрипционной организации кластера PFNA в геноме *B. longum* subsp. *longum* GT15

Наиболее эволюционно устойчивые функциональные ассоциации демонстрируют, как правило, гены в оперонах. Для подтверждения оперонной структуры кластера PFNA нами была изучена его транскрипционная организация в геноме *B. longum* subsp. *longum* GT15. Экспериментальный анализ включал в себя культивирование штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15, выделение тотальной РНК *B. longum* subsp. *longum* GT15, проведение реакции обратной транскрипции, постановка ПЦР на матрице полученной кДНК с использованием набора специфических праймеров с целью подтверждения предполагаемой оперонной организации, а также определение точки старта транскрипции методом быстрой амплификации 5'-концов кДНК (*англ.* rapid amplification of cDNA 5'-ends, 5'-RACE).

В результате транскрипционного анализа были получены ампликоны, соответствующие спейсерным участкам, что подтверждает полицистронность матрицы мРНК (рис. 2). Таким образом, гены *pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58*, *tgm*, а также гены *prpC*, *fha* и ген BLGT_RS02790 в геноме *B. longum* subsp. *longum* GT15 транскрибируются в составе единого оперона.

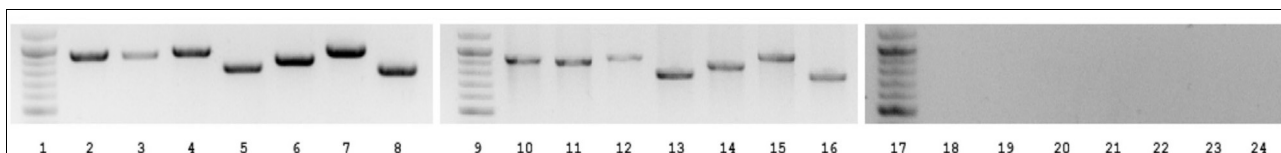


Рисунок 2. Электрофореграмма результатов амплификации фрагментов sp1-sp7. Дорожки: 1, 9, 17 - маркер длин ДНК (Fermentas 100bp Plus); 2-8, 10-16, 18-24 — ампликоны на матрице геномной ДНК, кДНК и тотальной РНК, соответственно; 2, 10, 18 — ампликон sp1; 3, 11, 19 – ампликон sp2; 4, 12, 20 – ампликон sp3; 5, 13, 21 – ампликон sp4; 6, 14, 22 – ампликон sp5; 7, 15, 23 – ампликон sp6; 8, 16, 24 — ампликон sp7.

В результате анализа была обнаружена точка старта транскрипции оперона, находящаяся на расстоянии -40-41 п.о. от стартового кодона белок-кодирующей последовательности гена *pkb2* (рис. 3). Также дополнительно была обнаружена точка старта транскрипции, локализованная внутри последовательности гена *tgm*, что может свидетельствовать о комплексной регуляции транскрипции генов оперона. Дополнительная точка старта транскрипции находится на расстоянии -58-61 п.о. от стартового кодона белок-кодирующей последовательности гена *prpC* (рис. 3).

Точка терминации транскрипции была предсказана на основании анализа структуры последовательностей спейсеров и генов оперона PFNA и его окружения в геномах *B. longum* subsp. *longum* GT15 и других представителей *B. longum* subsp. *longum*. В результате был обнаружен ρ -независимый терминатор, находящийся на расстоянии +65 п.о. от стоп-кодона белок-кодирующей последовательности гена *fha* (рис. 3). Другие ρ -независимые терминаторы в структуре оперона обнаружены не были.

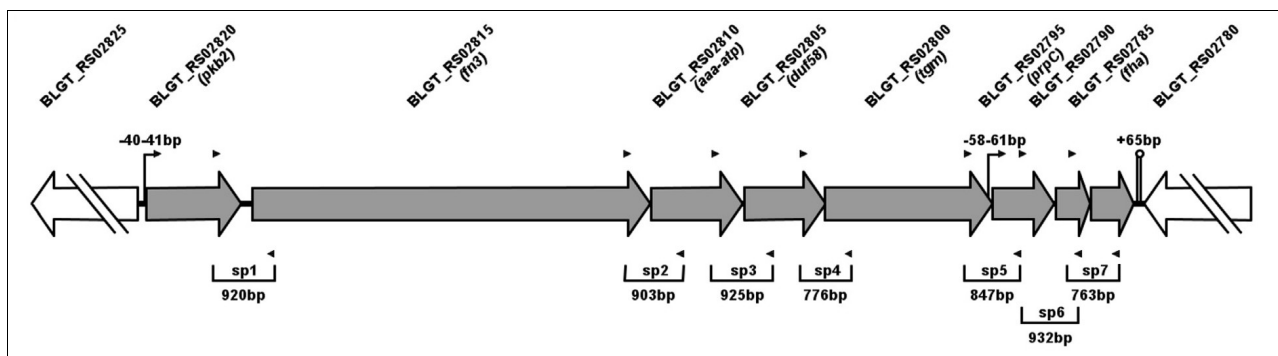


Рисунок 3. Выявленная транскрипционная организация кластера генов PFNA *B. longum* subsp. *longum* GT15. Для подтверждения транскрипционной организации были получены ампликоны sp1-sp7, соответствующие последовательностям межгенных спейсеров, а также участкам прилегающих генов. Указаны сайты посадки специфических праймеров (черные треугольники), длины амплифицируемых спейсерных регионов, локализация точек старта транскрипции (черные стрелки), а также локализация точки ρ -независимой терминации транскрипции (черная шпилька).

Анализ молекулярной эволюции последовательностей генов кластера PFNA в геномах представителей различных видов рода *Bifidobacterium*

Для подтверждения коэволюции генов кластера PFNA была проведена оценка корреляционной зависимости между значениями попарных эволюционных расстояний внутри индивидуальных филогенетических деревьев, построенных на основе выравниваний 43 последовательностей генов *pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58* и *tgm*. Высокие значения величин коэффициента корреляции Пирсона, полученные в результате попарного сравнения филогенетических деревьев (0,800-0,978), подтверждают гипотезу о коэволюции генов кластера PFNA.

Анализ молекулярной эволюции генов кластера PFNA проводили с помощью метода максимального правдоподобия. Принципиальная схема алгоритма анализа молекулярной эволюции генов кластера PFNA бифидобактерий представлена на рис. 4.

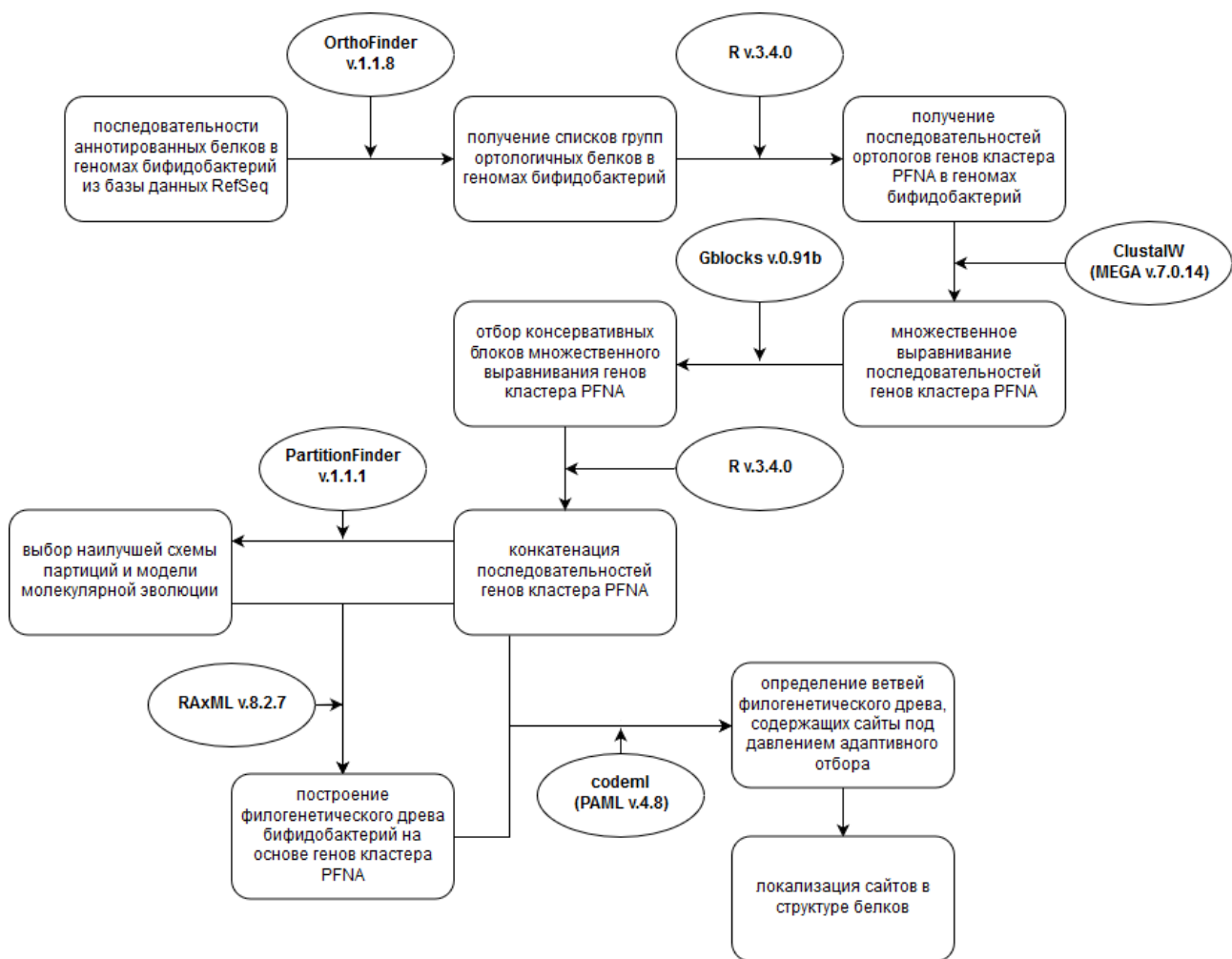


Рисунок 4. Принципиальная схема анализа молекулярной эволюции последовательностей генов кластера PFNA бифидобактерий.

На основе объединенных белок-кодирующих последовательностей генов кластера PFNA 43 представителей различных видов рода *Bifidobacterium* было построено неукорененное филогенетическое дерево (рис. 5).

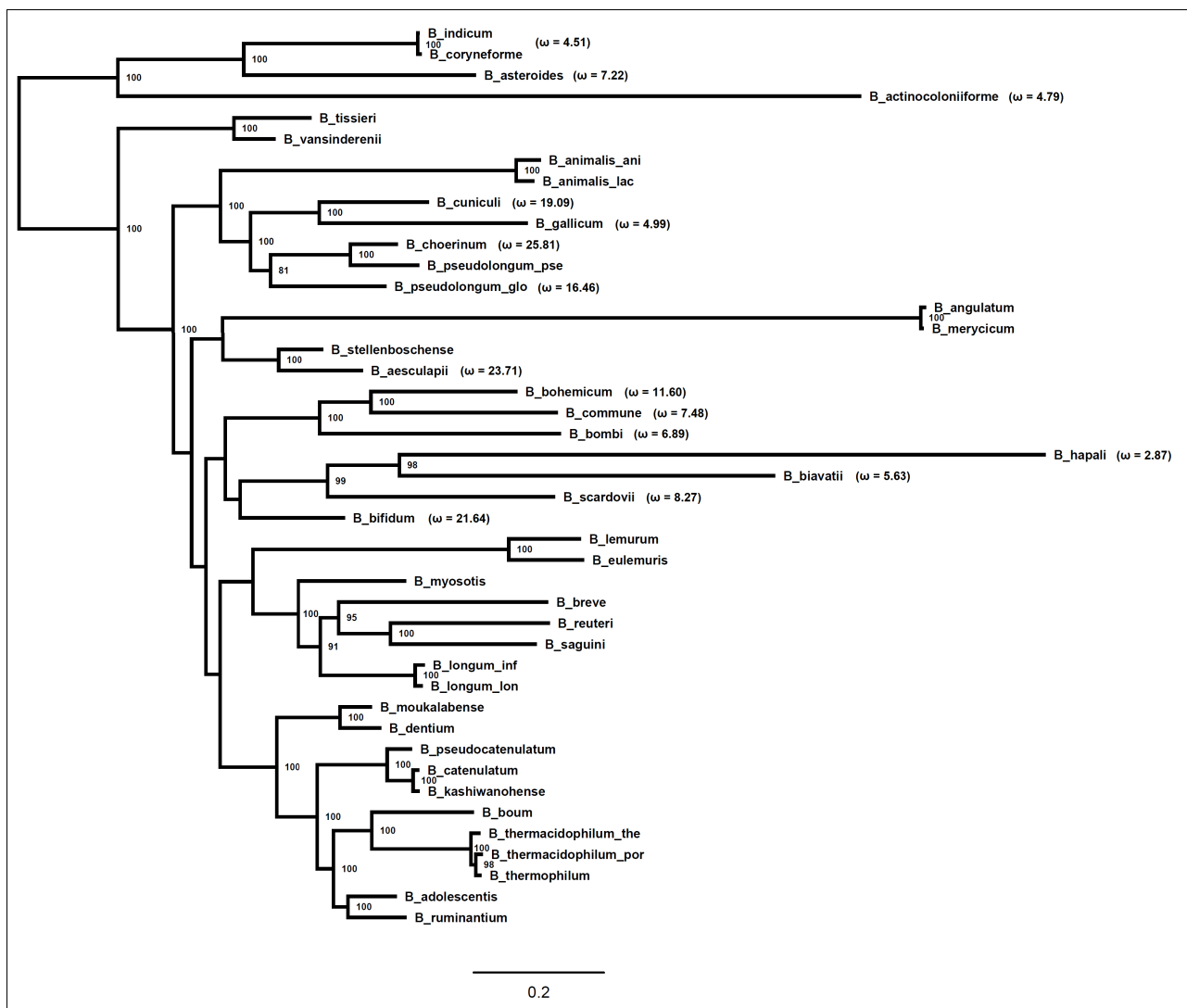


Рисунок 5. Филогенетического дерева, построенное на основе объединенных белок-кодирующих последовательностей генов кластера PFNA 43 представителей различных видов рода *Bifidobacterium*. Значения поддержек внутренних узлов филограммы получены после 10000 итераций бутстреп-анализа в программе RaXML. Поддержки в узлах филограммы со значением менее 70 на рисунке не представлены. Указаны конкретные значения ω для класса сайтов со значением $\omega > 1$ в тех ветвях филограммы, где показано наличие эпизодического положительного отбора в строгих условиях. Представлены оригинальные длины ветвей филогенетического дерева, масштабная линейка соответствует значению две предполагаемые замены на десять нуклеотидных сайтов.

Топология внешних клад полученного филогенетического дерева демонстрирует высокие значения поддержек узлов и с высокой точностью воспроизводит опубликованные филограммы бифидобактерий, несмотря на имеющиеся незначительные отличия. Топология полученного дерева воспроизводит следующие филогруппы рода *Bifidobacterium*: группы *B. asteroides*, *B. pseudolongum*, *B. longum*, *B. boum*, а также группу *B. bifidum*. Рассчитанные нами эволюционные дистанции (E_D) между парами таксонов *B. indicum* и *B. coryneforme* ($E_D =$

0,0089) и *B. catenulatum* и *B. kashiwanohense* ($E_D = 0,02$) оказались меньше, чем для пар таксонов *B. animalis* subsp. *animalis* и *B. animalis* subsp. *lactis* ($E_D = 0.0654$) и *B. longum* subsp. *infantis* и *B. longum* subsp. *longum* ($E_D = 0.0262$), относящихся к одному виду, что свидетельствует о высоком уровне генетического родства. На основе полученных данных было выдвинуто предположение, что исследуемые штаммы видов *B. indicum* и *B. coryneforme*, а также *B. catenulatum* и *B. kashiwanohense* должны быть реклассифицированы и объединены в один вид. Напротив, топология ветвей и эволюционные дистанции для пары таксонов *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* и *B. pseudolongum* subsp. *globosum* ($E_D = 0.4054$) свидетельствуют о несоответствии между полученными нами результатами и текущей классификацией бифидобактерий. На основе полученных данных было выдвинуто предположение, что исследуемые штаммы подвидов *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* и *B. pseudolongum* subsp. *globosum* должны быть отнесены к разным видам. Наши результаты согласуются с ранее предложенной реклассификацией.

Полученное филогенетическое дерево имеет высокие значения длин ветвей по сравнению с длинами ветвей опубликованных филогенетических деревьев, построенных на основе объединенных последовательностей коровых генов бифидобактерий. Данный факт указывает на высокую скорость молекулярной эволюции нуклеотидных последовательностей белок-кодирующих участков генов кластера PFNA по сравнению с консервативными последовательностями белок-кодирующих участков коровых генов, на которые, как правило, действует давление отрицательного отбора. Быстрая эволюция генов кластера PFNA обуславливает высокий уровень межвидовой дивергенции последовательностей и может быть следствием воздействия положительного отбора или ослабления воздействия отрицательного отбора.

В качестве объяснения феномену быстрой эволюции белок-кодирующих участков генов кластера PFNA бифидобактерий была выдвинута гипотеза о наличии событий продолжительного положительного отбора в молекулярной эволюции последовательностей. Анализ молекулярной эволюции проводили *in silico* с помощью метода максимального правдоподобия. Были получены значения функций максимального правдоподобия четырех «site» моделей и затем проведены тесты максимального правдоподобия (англ. likelihood ratio test, LRT) на наличие в последовательности нескольких классов сайтов с разными значениями ω , а также на наличие в последовательности сайтов, находящихся под давлением положительного отбора ($\omega > 1$) во всех ветвях филогенетического дерева. Значения LRT для обоих тестов оказались статистически значимыми ($LRT_1=16929,4$, $df=79$, $P \ll 0.01$ и $LRT_2=175,19$, $df=1$, $P \ll 0.01$ соответственно). Таким образом, экспериментально *in*

silico показано наличие в последовательности сайтов, находящихся под давлением положительного отбора во всех ветвях филогенетического дерева *Bifidobacterium*. Данные сайты были затем идентифицированы с помощью эмпирического Байесовского подхода. Сайты со значением апостериорной вероятности (*англ.* posterior probability, PP) > 0,7 были назначены в качестве кандидатов для воздействия положительного отбора. В результате были обнаружены два аминокислотных сайта, находящихся под давлением положительного отбора во всех ветвях филогенетического дерева бифидобактерий: 97T (PP=0.744, $\omega=1.322\pm 0.309$) и 100I (PP=0.858, $\omega=1.401\pm 0.248$) (координаты сайтов указаны для последовательности первичной структуры белка, кодируемого геном *tgm* кластера PFNA *B. longum* subsp. *longum* GT15) (рис. 6). Оба сайта-кандидата локализованы в трансмембранном домене (*англ.* transmembrane domain, TM) белка, кодируемого геном *tgm* кластера PFNA бифидобактерий. Предполагаемая трансглутаминаза, кодируемая геном *tgm* кластера PFNA бифидобактерий, представляет собой политопический альфаспиральный интегральный мембранный белок, подобно многим рецепторам, ионным каналам и транспортерам. В первичной структуре данного белка различных видов бифидобактерий аннотирован N-концевой регион, содержащий до восьми сопряженных трансмембранных α -спиралей которые могут способствовать формированию третичной структуры, участвующей в связывании лигандов. Согласно литературным данным, трансмембранные регионы, участвующие в связывании с лигандами, могут демонстрировать быструю эволюцию, расширяя репертуар связываемых лигандов семейства белков.



Рисунок 6. Локализация аминокислотных сайтов, находящихся под давлением продолжительного положительного отбора во всех ветвях филогенетического дерева бифидобактерий, в первичной структуре белка WP_038426324.1, кодируемого геном *tgm* кластера PFNA в геноме *B. longum* subsp. *longum* GT15. На рисунке представлена доменная организация белка, а также локализация сайтов-кандидатов со значением PP > 0,7.

В дополнении к обнаруженным событиям продолжительного положительного отбора, были протестированы гипотезы о наличии независимых событий эпизодического положительного отбора в молекулярной эволюции последовательностей генов кластера

PFNA различных видов бифидобактерий. Эпизодический отбор, воздействующий на отдельные сайты в индивидуальных ветвях и кладах филогенетического дерева, представляет собой наиболее распространенный случай положительного отбора. Были получены значения функций максимального правдоподобия двух «branch-site» моделей для тестируемых ветвей и клад, и затем проведены тесты LRT. Нами было показано наличие независимых событий положительного отбора в молекулярной эволюции генов кластера PFNA для большинства ветвей филогенетического дерева бифидобактерий (26 из 35 тестируемых ветвей), что объясняет высокую степень межвидовой дивергенции последовательностей. Проведенные тесты предполагают наличие групп сайтов со значением $\omega > 1$ в тестируемых ветвях по сравнению с остальными ветвями филогенетического дерева *Bifidobacterium*, следовательно, положительный отбор в молекулярной эволюции последовательностей генов кластера PFNA проявлял видоспецифический характер, воздействуя на группы сайтов в последовательностях, соответствующих отдельным ветвям филогении независимо от других ветвей.

Сайты-кандидаты для воздействия эпизодического положительного отбора в молекулярной эволюции последовательностей белок-кодирующих участков генов кластера PFNA были затем идентифицированы с помощью эмпирического Байесовского подхода ($PP > 0,7$) и локализованы в первичной структуре белков представителей различных видов рода *Bifidobacterium*. Сайты, на которые осуществляется давление отбора, могут быть структурно или функционально значимыми, и, таким образом, представляют собой вероятных кандидатов для расширения структурно-функциональной аннотации белков. Аннотация белков, кодируемых генами кластера PFNA, представляет собой важную задачу, так как структура и функции данных белков малоизучены.

Таким образом, нами было установлено, что гены кластера PFNA, участвуя в реализации механизмов коммуникации с факторами внешней среды, демонстрируют эффекты, описываемые гипотезой Черной Королевы. Необходимость адаптироваться к новым условиям в результате специализации и смены экологической ниши также могла увеличивать скорость эволюции в анализируемых генах. Мы показали, что продолжительный и эпизодический положительный отбор играл ключевую роль в быстрой эволюции генов *pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58* и *tgm*.

Сравнительный анализ уровня экспрессии гена *fn3* у представителей различных видов рода *Bifidobacterium*

В данной диссертационной работе мы проверили гипотезу о наличии зависимости между уровнем экспрессии гена *fn3* и силой отбора в геномах различных видов

бифидобактерий. Количественный анализ уровня экспрессии гена *fn3* у представителей различных видов бифидобактерий включал в себя построение кривых роста культивируемых штаммов бифидобактерий, выделение и очистку тотальной РНК, получение кДНК в ходе реакции обратной транскрипции, амплификацию фрагмента гена *fn3* представителей различных видов бифидобактерий в ходе реакции ПЦР в реальном времени с использованием видоспецифических праймеров и количественный анализ результатов. Анализ был проведен для штаммов *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527, *B. choerinum* DSM 20434, *B. pseudolongum* subsp. *globosum* DSM 20092, *B. angulatum* GT102, *B. breve* DSM 20213, *B. longum* subsp. *longum* GT15, *B. thermophilum* DSM 20210, *B. ruminantium* AC1786, *B. dentium* Bifido 9. В результате анализа транскрипционной активности мы показали, что ген *fn3* транскрибируется в геномах всех исследуемых штаммов. Сравнительный анализ начальных значений сигнала флуоресценции показал, что уровень экспрессии гена *fn3* широко варьирует в различных пробах и не зависит от силы и характера естественного отбора (рис. 7).

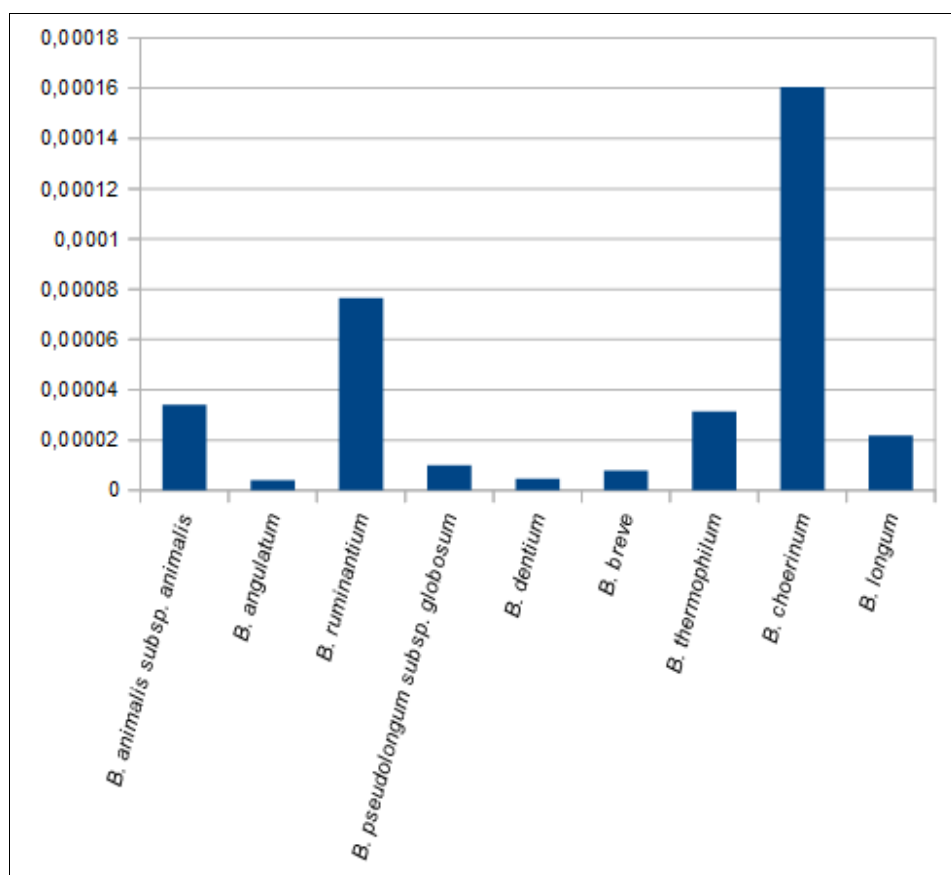


Рисунок 7. Сравнение начальных значений сигнала флуоресценции в пробах кДНК. По оси Y отложены значения начальных значений сигнала флуоресценции в единицах флуоресценции (англ. relative fluorescence units, RFU).

Изучение видоспецифичности киназно-субстратного взаимодействия в реакции перекрестного фосфорилирования *in vitro*

Положительный отбор и быстрая эволюция вносят изменения в структуру ортологичных белков различных видов бифидобактерий, что может приводить к формированию видоспецифичности белок-белкового взаимодействия коэволюционирующих функциональных партнеров. В данной диссертационной работе была изучена видоспецифичность киназно-субстратного взаимодействия СТПК Pkb2 и АТФазы AAA-АТР на примере штаммов *B. longum* subsp. *longum* GT15 и *B. choerinum* DSM 20434 в ходе киназной реакции *in vitro* с (γ -32P)-АТР в качестве маркера.

Принципиальная схема экспериментального изучения видоспецифичности киназно-субстратного взаимодействия в реакции перекрестного фосфорилирования *in vitro* представлена на рис. 8.

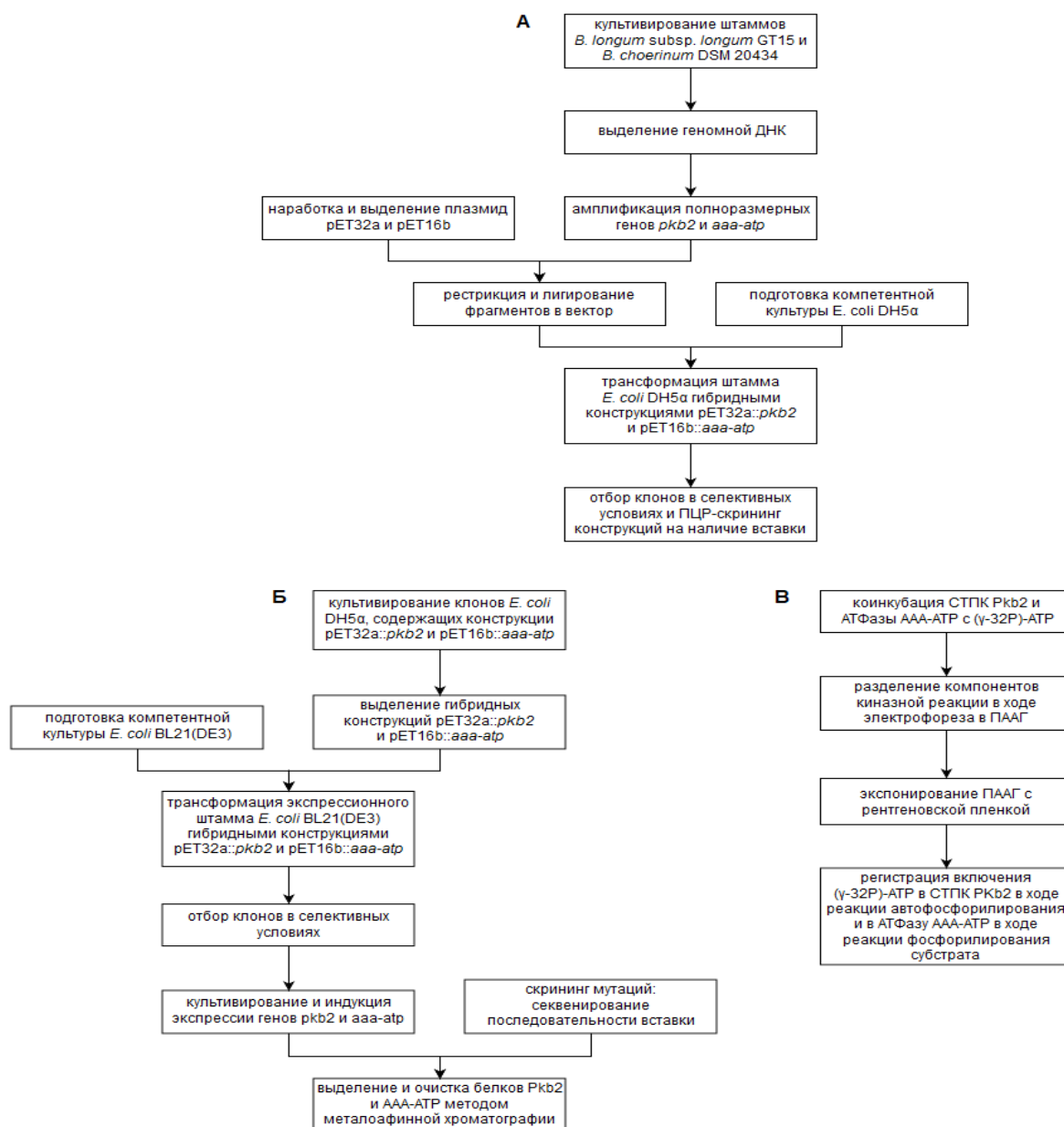


Рисунок 8. Принципиальная схема экспериментального изучения видоспецифичности киназно-субстратного взаимодействия *in vitro*. А - клонирование полноразмерных генов *pkb2* и *aaa-atp* *B. longum* subsp. *longum* GT15 и *B. choerinum* DSM 20434 в штамм *E. coli* DH5 α , Б - выделение и очистка полноразмерных белков Pkb2 и AAA-АТР из экспрессионного штамма *E. coli* BL21(DE3) методом металоаффинной хроматографии в нативных условиях, В - коинкубация СТПК Pkb2 и АТФазы AAA-АТР с (γ -³²P)-АТР и выявление фосфорилированных продуктов киназной реакции методом автордиографии.

В результате анализа нами впервые экспериментально была показана функциональная активность полноразмерных СТПК Pkb2 представителей видов *B. longum* subsp. *longum* и *B. choerinum*, субстратная видоспецифичность для СТПК Pkb2 *B. longum* subsp. *longum* GT15 и ее отсутствие для СТПК Pkb2 *B. choerinum* DSM 20434 (рис. 9, 10).

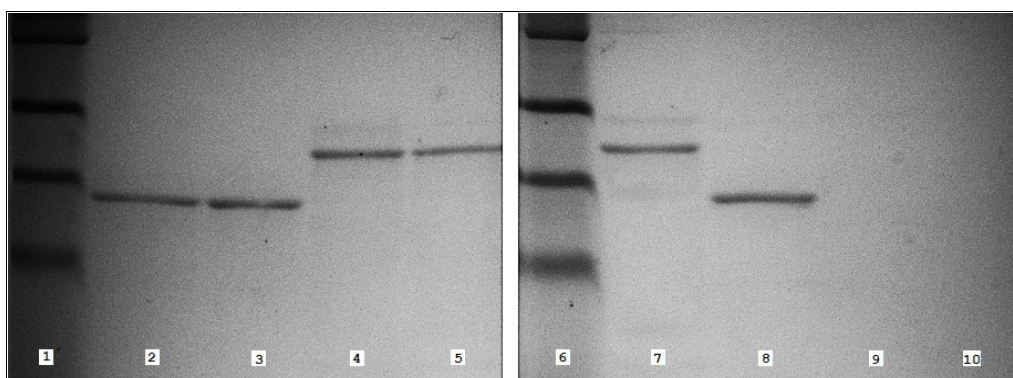


Рисунок 9. Электрофореграмма разделения компонентов киназной реакции. 1,6 – маркер молекулярного веса; 2 – Pkb2 GT15 + AAA-АТР GT15; 3 – AAA-АТР GT15; 4 – Pkb2 DSM 20434 + AAA-АТР DSM 20434; 5 – AAA-АТР DSM 20434; 7 – Pkb2 GT15 + AAA-АТР DSM 20434; 8 – Pkb2 DSM 20434 + AAA-АТР GT15; 9 – Pkb2 GT15; 10 – Pkb2 DSM 20434.

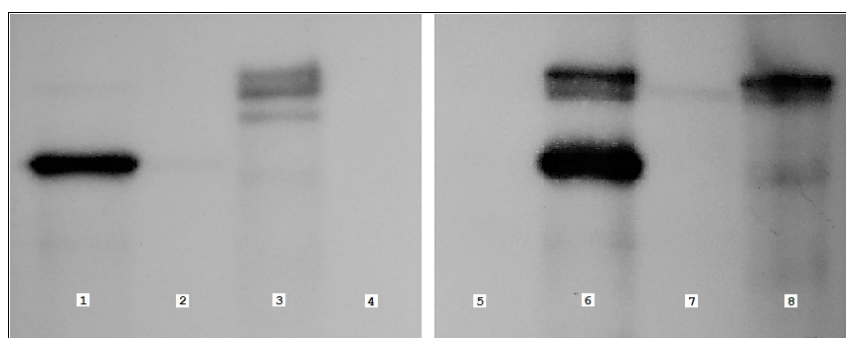


Рисунок 10. Выявление фосфорилированных продуктов киназной реакции методом автордиографии. 1 – Pkb2 GT15 + AAA-АТР GT15; 2 – AAA-АТР GT15; 3 – Pkb2 DSM 20434 + AAA-АТР DSM 20434; 4 – AAA-АТР DSM 20434; 5 – Pkb2 GT15 + AAA-АТР DSM 20434; 6 – Pkb2 DSM 20434 + AAA-АТР GT15; 7 – Pkb2 GT15; 8 – Pkb2 DSM 20434.

Оценка влияния ИЛ-6 как фактора иммунного ответа на рост культуры и экспрессию генов штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15

Быстрая эволюция и обнаруженный нами положительный отбор в последовательностях гена *fn3* бифидобактерий могут быть обусловлены участием в реализации механизмов коммуникации с иммунной системой организма хозяина в рамках гипотезы Черной Королевы. Для проверки данной гипотезы мы провели оценку влияния ИЛ-6 как фактора иммунного ответа на рост и экспрессию генов *B. longum* subsp. *longum* GT15. Согласно литературным данным, добавление цитокинов к культурам клеток микроорганизмов может оказывать влияние на скорость роста культуры и другие характеристики.

Принципиальная схема транскриптомного анализа в эксперименте по оценке влияния ИЛ-6 на экспрессию генов *B. longum* subsp. *longum* GT15 представлена на рис. 11.

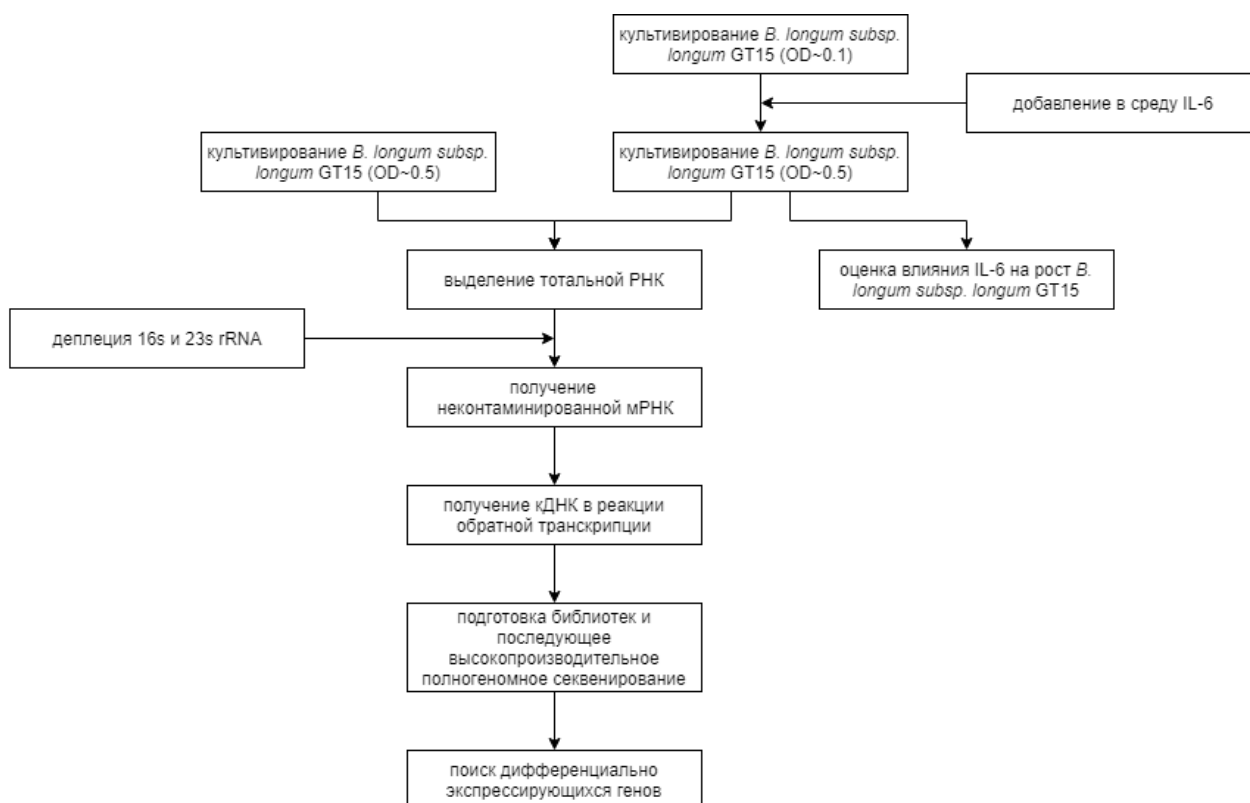


Рисунок 11. Принципиальная схема экспериментального анализа влияния ИЛ-6 на рост и экспрессию генов штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15.

В результате оценки влияния различных концентраций провоспалительного цитокина ИЛ-6 на рост штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15 мы показали, что добавление ИЛ-6 в различных концентрациях не влияет на скорость роста культуры *B. longum* subsp. *longum* GT15 (рис. 12).

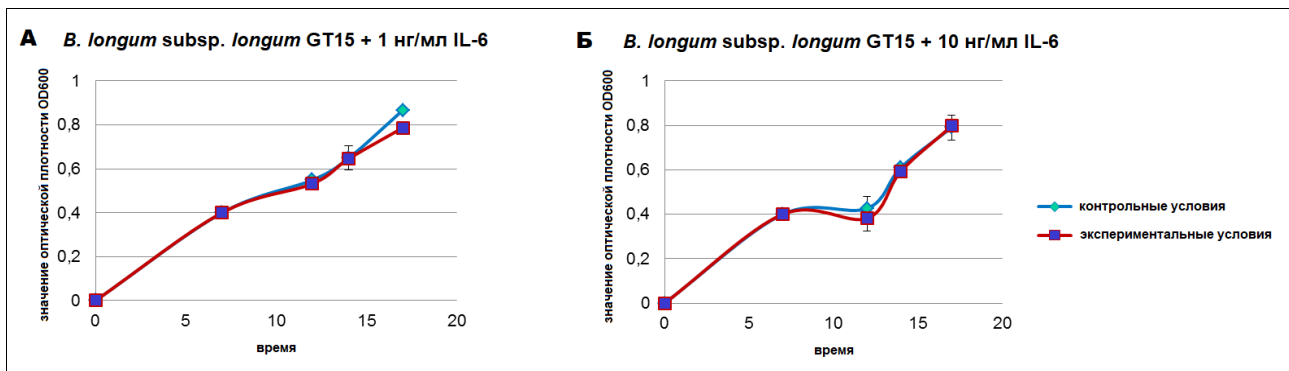


Рисунок 12. Скорость роста культуры штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15 в присутствии провоспалительного цитокина IL-6 в концентрации 1нг/мл (А) и 10нг/мл (Б) по сравнению с культивированием в нормальных условиях. По оси Y отложены значения оптической плотности (OD).

Проведенный нами транскриптомный анализ позволил оценить уровень экспрессии генов в экспериментальных условиях при добавлении провоспалительного цитокина IL-6 в концентрации 1нг/мл по сравнению с культивированием в контрольных условиях и охарактеризовать обнаруженные дифференциально экспрессирующиеся гены. Транскриптомный анализ не выявил изменения в уровне экспрессии гена *fn3* и других генов кластера PFNA по сравнению с нормальными условиями, однако выявил изменения в уровне экспрессии ряда других генов, предположительно участвующих в реализации механизмов устойчивости к факторам иммунного ответа бифидобактерий как комменсальных представителей микробиоты.

Функциональная характеристика дифференциально экспрессирующихся генов показала, что добавление в среду IL-6 приводит к увеличению уровня экспрессии генов, участвующих в реализации механизмов стрессового ответа (BLGT_00625, BLGT_06345, BLGT_04965). Увеличение уровня экспрессии белка RaiA, участвующего в аресте трансляции в условиях стрессового ответа, сопровождается уменьшением уровня экспрессии 50S рибосомального белка L3, что приводит к снижению уровня трансляции и, следовательно, базового метаболизма клеток. Пероксиредоксин, кодируемый геном BLGT_04965, относится к семейству белков, которые контролируют уровень цитокин-индуцированных пероксидов в клетках млекопитающих. Также происходит увеличение уровня экспрессии группы генов, ответственных за утилизацию и потребление гликопротеинов и других субстратов (BLGT_00140, BLGT_01150, BLGT_08670, BLGT_08680), что может быть связано с необходимостью накопления веществ для увеличения жизнеспособности в стрессовых условиях под воздействием факторов иммунного ответа.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что кластер генов PFNA (*pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58* и *tgm*) представляет собой эволюционно стабильную группу функционально связанных генов, обнаруживаемых совместно в геномах представителей различных видов рода *Bifidobacterium*, и, подобно *pkb2*, демонстрирующих высокую степень межвидовой дивергенции последовательностей;

2. Впервые установлена оперонная организация кластера генов PFNA в геноме *B. longum* subsp. *longum* GT15. Обнаружена точка старта транскрипции и р-независимый терминатор транскрипции оперона PFNA. Также была обнаружена дополнительная точка старта транскрипции внутри последовательности гена *tgm* на расстоянии -58-61 п. о. от стартового кодона белок-кодирующей последовательности гена *prpC*, что может свидетельствовать о комплексной регуляции транскрипции генов оперона в геноме *B. longum* subsp. *longum* GT15.

3. Установлены причины высокого уровня межвидовой дивергенции последовательностей генов кластера PFNA. В молекулярной эволюции гена *tgm* обнаружены события продолжительного положительного отбора во всех ветвях филогенетического дерева. В молекулярной эволюции генов *pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58* и *tgm* обнаружены независимые события эпизодического положительного отбора для большинства ветвей филогенетического дерева *Bifidobacterium*.

4. Ген *fn3* транскрибируется в геномах девяти исследуемых штаммов бифидобактерий различных видов. Сравнительный анализ начальных значений сигнала флуоресценции показал, что уровень экспрессии гена *fn3* широко варьирует в различных пробах и не зависит от силы и характера естественного отбора.

5. Впервые экспериментально показана функциональная активность полноразмерных СТПК Pkb2 представителей видов *B. longum* subsp. *longum* и *B. choerinum*, субстратная видоспецифичность для СТПК Pkb2 *B. longum* subsp. *longum* GT15 и ее отсутствие для СТПК Pkb2 *B. choerinum* DSM 20434.

6. Добавление в среду провоспалительного цитокина IL-6 не оказывает влияния на рост *B. longum* subsp. *longum* GT15 и экспрессию генов кластера PFNA, однако оказывает влияние на экспрессию ряда других генов, предположительно участвующих в реализации механизмов устойчивости к факторам иммунного ответа бифидобактерий.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, соответствующих Перечню ВАК:

1. **Dyachkova, M. S.**, Klimina, K. M., Kovtun, A. S., Zakharevich, N. V., Nezametdinova, V. Z., Averina, O. V., and Danilenko, V. N. (2015). Draft genome sequences of *Bifidobacterium angulatum* GT102 and *Bifidobacterium adolescentis* 150: focusing on the genes potentially involved in the gut-brain axis. *Genome Announcement*, 3(4), e00709-15.
2. Nezametdinova, V. Z., Mavletova, D. A., Alekseeva, M. G., **Chekalina, M. S.**, Zakharevich, N. V., and Danilenko, V. N. (2018). Species-specific serine-threonine protein kinase Pkb2 of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*: Genetic environment and substrate specificity. *Anaerobe*, 51, 26-35.
3. Zakharevich, N. V., Nezametdinova, V. Z., Averina, O. V., **Chekalina, M. S.**, Alekseeva, M. G., Danilenko, V. N. (2019). Complete genome sequence of *Bifidobacterium angulatum* GT102: potential genes and systems of communication with host. *Russian Journal of Genetics*, 55(7), 847–864.
4. **Dyachkova, M. S.**, Chekalin, E. V., Danilenko, V. N. (2019). Positive selection in *Bifidobacterium* genes drives species-specific host-bacteria communication. *Frontiers in microbiology*, 10, 2374.

Публикации в сборниках материалов конференций:

1. **M. Chekalina**, V. Danilenko. Study of the PFNA cluster in bifidobacteria: structure, evolution and possible functions. FEBS Open Bio, Volume 8, Issue S1. Supplement: 43rd FEBS Congress, Biochemistry Forever, Prague, Czech Republic, July 7-12, 2018.
2. **М. С. Чекалина**, К. М. Климина, В. Н. Даниленко. Изменение профиля экспрессии генов штамма *Bifidobacterium longum* GT15 в условиях воздействия провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF α . Acta Naturae, Спецвыпуск, Том 1. Научные труды II Объединенного научного форума, Сочи-Дагомыс, Россия, 1-6 октября, 2019.