

ВИДОФОРМИРУЮЩИЙ *PFNA*-ОПЕРОН БИФИДОБАКТЕРИЙ: МОДУЛИ СЕНСОРНЫХ БЕЛКОВ Pkb2 и FN3, СТРУКТУРА И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДИ РАЗНЫХ ВИДОВ И ШТАММОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ В МИКРОБИОМЕ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА¹

© 2022 г. В. Н. Даниленко¹, *, М. Г. Алексеева¹, Т. А. Кошенко¹,
А. С. Ковтун¹, В. З. Незаметдинова¹

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

*e-mail: valerid@vigg.ru

Поступила в редакцию 22.03.2022 г.

После доработки 31.03.2022 г.

Принята к публикации 05.04.2022 г.

Недавно нами был открыт и исследован видоспецифический (видоформирующий) оперон *PFNA* бифидобактерий. Гены *pkb2* и *fn3* оперона кодируют белки, которые могут участвовать в восприятии сигналов организма хозяина. Было показано, что ген *fn3* кодирует FN3-белок, содержащий два фибронектиновых домена с мотивами цитокиновых рецепторов. Фрагмент этого белка способен селективно связываться с TNFα. Предполагается, что *PFNA*-оперон *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* GT15 контролирует двунаправленную коммуникацию с элементами (цитокинами) иммунной системы человека. В данной работе с использованием баз данных секвенированных геномов видов бифидобактерий – обитателей микробиоты желудочно-кишечного тракта человека, исследовали внутривидовой полиморфизм сенсорного C-концевого домена Pkb2 (SCD Pkb2 – sensor C-end domain) и фрагмента белка FN3, содержащего два FN3-домена (2D FN3). В изучаемых доменах каждого из восьми исследованных видов бифидобактерий различного географического происхождения обнаружены значимые неповторяющиеся аминокислотные замены, позволяющие выделить от двух до пяти групп у каждого вида бифидобактерий. С использованием программы trRosetta показано, что обнаруженные замены аминокислот могут приводить к изменению 3D-структур анализируемых доменов. Предполагается, что обнаруженная кластеризация штаммов может отражать гетерогенность в популяциях бифидобактерий у людей, из которых они были выделены, по иммунному статусу. Сформированы каталоги белков SCD Pkb2 и 2D FN3, включающие значимые замены аминокислот у восьми исследуемых видов, относящихся к четырем филогенетическим группам: *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* и *B. pseudolongum*. С использованием ранее разработанных алгоритмов и созданного каталога установили встречаемость исследуемых групп штаммов в метагеномах здоровых жителей Москвы двух возрастных групп: дети 3–5 лет и взрослые старше 18 лет. Разработанный подход предполагается использовать для изучения корреляции различного иммунного статуса и наличия в микробиоте штаммов бифидобактерий, принадлежащих к конкретным группам, кластеризованным по заменам аминокислот в SCD Pkb2 и 2D FN3.

Ключевые слова: микробиом кишечника, бифидобактерии, *PFNA*-оперон, SCD Pkb2-сенсорный белок, 2D FN3-сенсорный белок, рецепторы элементов иммунной системы.

DOI: 10.31857/S0016675822090077

Бифидобактерии – анаэробные бактерии, существовавшие на планете Земля до появления на ней кислорода и после его появления, заселившие анаэробные полости практически всех представителей животного мира от насекомых до человека [1–3]. Род *Bifidobacterium* насчитывает 99 видов, одиннадцать из которых встречаются в ЖКТ чело-

века [3, 4]. Человеческие виды бифидобактерий относятся к четырем филогенетическим группам: *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. pseudolongum* [3]. Частоты встречаемости разных видов у человека существенно различаются. Также различаются частоты встречаемости одного и того же вида у детей и взрослых [5–7]. Бифидобактерии участвуют в формировании иммунной системы своих хозяев [8–10]. Хорошо известно, что подвид *B. longum* subsp. *infantis* и вид *B. bifidum* первыми после рождения заселяют кишечник человека и форми-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675822090077 для авторизованных пользователей.

руют иммунную систему ребенка [7, 11]. Интенсивно исследуется роль бифидобактерий и их компонентов (метаболитов) в коммуникации кишечника—мозг и кишечник—иммунная система [12, 13]. Относительно хорошо изучены метаболиты и компоненты клеток бифидобактерий, модулирующие с помощью тех или иных механизмов активность иммунной системы [14, 15]. Вместе с тем, практически ничего не известно о сигнальных системах (белках, рецепторах и др.), способных воспринимать сигналы иммунной системы, в том числе осуществлять взаимодействия с цитокинами [9, 16, 17].

Ученые лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН открыли и исследовали видоспецифический оперон *PFNA* бифидобактерий, ответственный за такие взаимодействия [18, 19]. Оперон *PFNA* встречается в геномах большинства видов бифидобактерий [13], включая 11 видов, встречающихся у человека. В состав оперона входят пять основных генов: *pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58*, *tgm*. Серин-треониновая протеин киназа Pkb2, кодируемая геном *pkb2*, является белком сигнальной трансдукции и состоит из N-концевого внутриклеточного домена и C-концевого сенсорного внеклеточного домена (SCD), способного связываться с сигналом внешней среды (лигандом). На данный момент лиганд неизвестен, и его идентификация является важной научной и практической задачей. Ген *fn3* кодирует FN3-белок, содержащий два фибронектиновых домена с мотивами цитокиновых рецепторов. Впервые в мире нами было показано, что фрагмент FN3-белка способен селективно связываться с фактором некроза опухоли TNF α [17].

В статье представлены результаты исследований полиморфизма SCD Pkb2 и фрагмента белка FN3, содержащего два FN3-домена (2D FN3), с целью выявить основные группы аминокислотных замен, получить прогноз влияния замен на пространственные структуры доменов, а также определить встречаемость различных групп аминокислотных замен в метагеномах российских жителей (детей и взрослых).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск последовательностей доменов сенсорных белков SCD Pkb2 и 2D FN3 в метагеномных данных

Полные метагеномы для проведения биоинформатического анализа были получены нами и внесены в базу данных NCBI SRA ранее, в рамках реализации проектов РНФ № 17-15-01488 и № 20-14-00132. Всего в анализируемое множество вошло 23 метагенома микробиоты кишечника здоровых детей в возрасте 3–5 лет (идентификационный номер в базе данных NCBI SRA — PRJNA516054) и 38 метагеномов микробиоты кишечника здоровых

взрослых людей (PRJNA762199). Отбор здоровых детей и взрослых проводился среди жителей г. Москвы. В группы включались добровольцы, соответствующие следующим критериям: отсутствие психиатрического заболевания, отсутствие острых инфекционных заболеваний и хронических аутоиммунных заболеваний, отсутствие соматических заболеваний, способных повлиять на результаты молекулярного тестирования (например, ВИЧ, рак, диабет), прием курса антибиотиков не позднее трех месяцев до даты взятия фекальных проб, хронический прием антибиотиков. Оценка психологического здоровья детей проводилась в соответствии с диагностическим и статистическим руководством по психическим расстройствам пятого издания (DSM-V), а взрослых — в соответствии с опросником центра эпидемиологических исследований (CES-D) и опросником генерализированного тревожного расстройства (ГТР-7). Оценка качества метагеномных чтений была проведена при помощи программы FastQC версии 0.11.9 [20], а исправление ошибок секвенирования и удаление адаптеров — при помощи Trimmomatic версии 0.39 [21]. Далее чтения были собраны в контиги с использованием metaSPAdes версии 3.14.1 [22]. Поиск аминокислотных последовательностей доменов сенсорных белков SCD Pkb2 и 2D FN3 из соответствующих каталогов выполнялся в контигах программой BLASTx версии 2.10.1 [23]. Отбор результатов проводился по критериям: гомология между определенной последовательностью и референсом не менее 90%, а длина — не менее 70% от длины референса.

Биоинформатический анализ

Последовательности генов и белков бифидобактерий, обсуждаемые в статье, были получены из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). В работе использовали следующие программы: BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для выявления полиморфизма аминокислотных последовательностей; Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) для множественных выравниваний аминокислотных последовательностей; SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) для идентификации доменов белков FN3; Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>) для идентификации трансмембранных доменов белка Pkb2 (TM-домен); trRosetta (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>) для предсказания пространственных структур фрагментов белков [24]. В качестве референтных штаммов конкретных видов бифидобактерий для распределения по группам аминокислотных замен использовались либо типовые штаммы, либо выделенные нами лабораторные штаммы с секвенированным геномом: *B. longum* subsp. *longum* GT15 [25] и *B. angulatum* GT102 [26]. Позиции

<i>B. lactis</i>	AWMVAGFTVALLTLFLAVFMGFVLEGLDTHASGNQTVVEGSHGALQ--NGERPEPTG	368
<i>B. adolescent</i>	-LAVTVAAAAAVVVMALAFVTVVMPNMDAASDNSKVQVQ-NHGAQNHA---EDDPDS	376
<i>B. bifidum</i>	-LAITAVVVAALTAVALTFVFVVMPHMDTATRNRTSVS-TPGATGDSNGTGNPDD	374
<i>B. longum</i>	-VGITVVGILAAITAAALI FAFVVVPRMDSATGSDTKQVA-TPGTKDDNRRNNQDDV	371
	 * . . . * . * . * * :	
<i>B. lactis</i>	NEPPGASVVFSPQQLSGTLDEN-GIAHFFHWRNPDRECDTYVWSRIGAATTPGASHV--V	425
<i>B. adolescent</i>	--AITSGSVPSVQDLTGEYTAD-SKVRFTWVNPSPKDGDSYAWSLVGDSGTDPAQGG--T	431
<i>B. bifidum</i>	IT--GAEVVPTPENLNGTY--DGTTVTFWTNPQPKDGDYAWSPVQGSNATSGPSTSTN	430
<i>B. longum</i>	ITDTANAQITSPENLNGTYAADGSSVTFWTNPDQSGDTYAWAIVQGSNTDQSAQT--V	429
	: * : : * . * : . * * * . * . * . * : : :	
<i>B. lactis</i>	DSTGFDIPADQTDQAQVCRVSVIVRADRSMSAQPAIACAVRK--	467
<i>B. adolescent</i>	TTESTSIEIDPADGAQTCVQVSLVRADRMSENPMIACAAP--	473
<i>B. bifidum</i>	IVADRKVELHDVTDKQTCIEVVKIVRSQDKQMSQNPAAIACAVRQ--	472
<i>B. longum</i>	TTSDDPTVTVNAQEGSQTICIQSVIVRKNRQMSVSPAAIACAAPQ	473
	. : . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . :	

Рис. 1. Выравнивание последовательностей TM и SCD Pkb2 между филогенетическими группами с использованием одного часто встречающегося в микробиоте человека представителя каждой группы. TM-домен отмечен шрифтом с подчеркиванием. Коровые аминокислоты SCD Pkb2 указаны белыми буквами на черном фоне и звездочкой под строкой. Обозначения видов: *B. lactis* — *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140; *B. adolescent* — *B. adolescentis* ATCC 15703; *B. bifidum* — *B. bifidum* PRL 2010; *B. longum* — *B. longum* subsp. *longum* GT15.

аминокислот и аминокислотных замен указаны по полной последовательности Pkb2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Анализ сенсорных последовательностей белков Pkb2 бифидобактерий человека

1.1. Идентификация коровых аминокислот в последовательностях SCD Pkb2 у видов бифидобактерий, выделенных из микробиоты человека. Протяженность белка Pkb2 у изучаемых видов бифидобактерий человека составляет от 376 до 492 а.о.; N-концевой каталитический домен от 314 до 348 а.о.; TM-домен 20–25 а.о.; SCD 120–135 а.о. (Приложение, табл. 1). Аминокислотные последовательности Pkb2 практически идентичны у штаммов внутри вида и сильно дивергированы между видами [13, 19].

Для сравнения последовательностей TM и SCD Pkb2 были выбраны по одному виду бифидобактерий из каждой филогенетической группы, которые часто встречаются у человека и для которых секвенировано не менее 50 геномов: *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* (Приложение, табл. 2). Проведенное множественное выравнивание аминокислотных последовательностей TM и SCD Pkb2 позволило выявить коровые аминокислоты, имеющиеся у SCD Pkb2 всех видов, встречающихся у человека (рис. 1).

1.2. Полиморфизм аминокислотных последовательностей SCD Pkb2 различных видов бифидобактерий, выделенных из микробиоты человека. Анализ проводился для часто встречающихся в микробиоте человека видов и подвидов бифидобактерий: *B. longum* subsp. *longum*, *B. adolescentis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. pseudocatenulatum*, и для

редко встречающегося у человека вида *B. angulatum*, а также для *B. longum* subsp. *infantis*, который часто встречается только у младенцев [27, 28]. Учитывались только замены, часто встречающиеся в базе данных секвенированных геномов (5 и более раз). У большинства штаммов подвидов *B. longum* subsp. *infantis* и *B. longum* subsp. *longum* изучаемая последовательность Pkb2 идентична референтной последовательности штамма GT15 [25] (группы 1.1 и 2.1) (табл. 1). Большая группа штаммов *B. longum* subsp. *longum* имеют SCD Pkb2, содержащий замену 400 Т→А (группа 1.2). Кроме того, у *B. longum* subsp. *longum* обнаружена небольшая группа из восьми штаммов, содержащая последовательность с заменой 363 N→Т (группа 1.3). Девятнадцать штаммов подвида *B. longum* subsp. *infantis* имеют спорадические замены. Три такие штамма содержат замены четырех коровых аминокислот в сочетании с заменами некоровых аминокислот (табл. 1; группы 2.2, 2.3, 2.4). У других изученных видов замены коровых аминокислот не обнаружены. Последовательности SCD Pkb2 штаммов *B. adolescentis* можно разделить на четыре группы: группа 3.1 — штаммы не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом ATCC 15703; группа 3.2 — содержат замену 397 S→G; группа 3.3 — содержат замены 353 А→S(+); 397 S→G; группа 3.4 — содержат замены 366 А→Т; 397 S→G. Замена 397 S→G, таким образом, встречается у всех штаммов *B. adolescentis*, имеющих замены (группы 3.2, 3.3, 3.4). Последовательности SCD Pkb2 во всех секвенированных геномах *B. angulatum* являются идентичными (группа 4). Штаммы *B. animalis* subsp. *lactis* можно разделить на две группы: у подавляющего большинства штаммов последовательности идентичны референтной последовательности штамма

Таблица 1. Наличие аминокислотных замен в последовательности SCD Pkb2 у видов *Bifidobacterium*, встречающихся в микробиоте человека (по базе данных NCBI)

Вид бифидобактерий (количество секвенированных геномов)	Группа	Количество геномов	Штамм	Pkb2, номер белкового продукта	Наличие замен аминокислот
1. <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (478 геномов)	1.1	353	GT15	WP_007057781.1	Нет
	1.2	123	ATCC 55813	WP_032746814.1	400 T→A
	1.3	8	JCM 7053	WP_101026033.1	363 N→T
	2.1	29	157F	WP_007057781.1	Нет
2. <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> (48 геномов)	2.2	1	BT1	WP_060620037.1	357 G→R* ; 469 A→S (+)
	2.3	1	LH_665	WP_174774163.1	376 A→V; 388 G→S*
	2.4	1	IN-07	WP_065436081.1	461 V→A; 466 A→T* ; 468 A→E*
	3.1	4	ATCC 15703	WP_011743628.1	Нет
3. <i>B. adolescentis</i> (102 генома)	3.2	20	AM34-11	WP_117805832.1	397 S→G
	3.3	31	Km4; 150	WP_038444944.1	353 A→S (+); 397 S→G
	3.4	8	MSK.20.2	WP_217717171.1	366 A→T; 397 S→G
	3.5	10	70B	WP_085407849.1	366 A→T; 397 S→G; 437 S→R
4. <i>B. angulatum</i> (6 геномов)	4	6	GT102	WP_052946515.1	Нет
5. <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (118 геномов)	5.1	94	DSM 10140	WP_004218258.1	Нет
	5.2	11	ATCC 25527	WP_014698127.1	от 9 до 16 спорадических замен
6. <i>B. bifidum</i> (131 геном)	6.1	28	PRL 2010	WP_013389588.1	Нет
	6.2	17	са_0067	WP_129901282.1	348 T→A
	6.3	22	YIT 10347	WP_230094024.1	463 N→D (+)
	6.4	11	LMG 11583	WP_047298710.1	424 G→V
	6.5	7	85B	WP_047285264.1	406 K→R (+); 433 A→V; 463 N→D (+)
7. <i>B. pseudocatenulatum</i> (140 геномов)	7.1	35	JCM 1200	WP_004221354.1	Нет
	7.2	23	YIT12232	WP_226595471.1	399 S→G
	7.3	7	YIT11027	WP_226590582.1	363 K→E (+)
	7.4	9	CA-C29	WP_065435345.1	399 S→G; 443 K→D

* Полуужирным шрифтом указаны спорадические замены у *B. longum* subsp. *infantis*, совпадающие с коровыми аминокислотами.

DSM10140 (группа 5.1); также выделяется небольшая группа из 11 штаммов (группа 5.2), имеющая в SCD от 9 до 16 спорадических замен. Вид *B. bifidum* разделяется на пять групп: самая многочисленная группа не имеет замен в изучаемом домене (группа 6.1); три небольшие группы — по 10–20 штаммов с одиночными заменами (группы 6.2, 6.3, 6.4) и маленькая группа из семи штаммов, имеющая комбинацию из трех замен (группа 6.5). Штаммы *B. pseudocatenulatum* делятся на группу без замен (группа 7.1) и на три группы (7.2, 7.3, 7.4), имеющие одиночные или двойные замены, самая частая из которых S→G.

Составлен каталог SCD Pkb2 из геномов разных видов бифидобактерий, включающий последовательности, содержащие выявленные аминокислотные замены (Приложение, табл. 3).

1.3. Предполагаемая пространственная структура ТМ и SCD Pkb2 у видов бифидобактерий, выделенных из микробиоты человека. Предсказанные программой trRosetta 3D структуры ТМ и SCD Pkb2 трех основных видов бифидобактерий — обитателей ЖКТ человека: *B. adolescentis*, *B. bifidum* и *B. longum*, оказались похожи. ТМ-домен представляет собой спиральную структуру, а SCD представляет собой комбинацию 5–6 антипараллельных β-слоев (рис. 2,а). SCD Pkb2 у редкого для человека вида *B. angulatum* очень короткий (Приложение, табл. 1), и его пространственная структура существенно отличается (рис. 2,а).

У трех штаммов у *B. longum* subsp. *infantis* обнаружены четыре замены в SCD Pkb2, совпадающие с коровыми аминокислотами Pkb2 у человеческих видов бифидобактерий (табл. 1). Замены коровых аминокислот не встречаются по одиночке, а только в комбинации с другими заменами не коровых аминокислот. Были предсказаны 3D структуры С-концевых доменов этих трех штаммов. Предполагаемая пространственная структура существенно не изменялась (рис. 2,б). Попытка моделировать пространственную структуру SCD Pkb2 у гипотетического штамма с одиночной заменой коровой аминокислоты показала, что структура домена при этом существенно нарушается, что, предположительно, может привести к потере функции.

2. Анализ сенсорных последовательностей 2D FN3-белков PFNA-оперона бифидобактерий — обитателей ЖКТ человека

2.1. Фибронектин-содержащие домены FN3-белков бифидобактерий. FN3-белок, кодируемый геном *fn3* PFNA-оперона бифидобактерий (рис. 3,а), содержит два фибронектиновых домена типа 3 (домены FN3) [19], локализованных в С-концевой области. Объектами исследования являются белки, содержащие только два фибронектиновых доме-

на, обозначенные нами как 2D FN3. Сенсорная последовательность 2D FN3 штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15 состоит из 184 аминокислотных остатков.

2.2. Идентификация коровых аминокислот в сенсорных последовательностях 2D FN3 у референтных штаммов бифидобактерий. Проведено выравнивание последовательностей 2D FN3 из девяти видов бифидобактерий, относящихся к трем филогенетическим группам: группа *B. adolescentis* (*B. adolescentis*, *B. catenulatum* subsp. *catenulatum*, *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense*, *B. dentium*, *B. pseudocatenulatum*); *B. longum* (*B. longum*, *B. breve*, *B. angulatum*) и группа *B. bifidum* (*B. bifidum*) [3]. В качестве референтных штаммов использовались: *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. bifidum* LMG 11041, *B. breve* LMG 13208, *B. catenulatum* LMG 11043, *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* DSM 21854, *B. dentium* JCM 1195, *B. pseudocatenulatum* LMG 10505, *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 [3], *B. longum* subsp. *longum* GT15 [25] и *B. angulatum* GT102 [26].

Выравнивание последовательностей (рис. 4) 2D FN3 показало, что последовательности первого домена имеют большую гомологию, чем последовательности второго домена, выявлены коровые (консервативные) аминокислоты. В первом домене выявлена 31 коровая аминокислота, во втором домене — 10 коровых аминокислот.

Гомология последовательностей 2D FN3 *B. longum* subsp. *longum* GT15 и *B. adolescentis* ATCC 15703 составляет: 62.4% идентичности, 84.5% сходства.

Последовательности 2D FN3 у *B. bifidum* и у *B. angulatum* имеют более существенные отличия от последовательностей других видов бифидобактерий из ЖКТ человека. Гомология данных последовательностей *B. longum* subsp. *longum* GT15 и *B. bifidum* LMG 11041 составляет: 54.6% идентичности, 77.0% сходства; гомология последовательностей 2D FN3 *B. longum* subsp. *longum* GT15 и *B. angulatum* GT102 составляет: 41.1% идентичности, 68.6% сходства.

Ранее нами было выявлено, что мотивы цитокинных рецепторов были различны у трех видов бифидобактерий: у *B. longum*: WSXPS и WSXES, у *B. bifidum*: WSXPS и EG-PS, а у *B. angulatum*: WSXYS и SGXQA, что может быть связано с взаимодействием с различными цитокинами [19, 26]. Таким образом, полученные данные совпадают.

2.3. Распределение по группам штаммов внутри каждого из видов бифидобактерий, обитающих в ЖКТ человека. Проведен биоинформатический анализ наличия полиморфизма в сенсорных последовательностях 2D FN3 в секвенированных геномах штаммов бифидобактерий из разных коллекций (в основном зарубежных), выделенных из ЖКТ человека. По результатам данного сравнительного анализа в секвенированных ге-

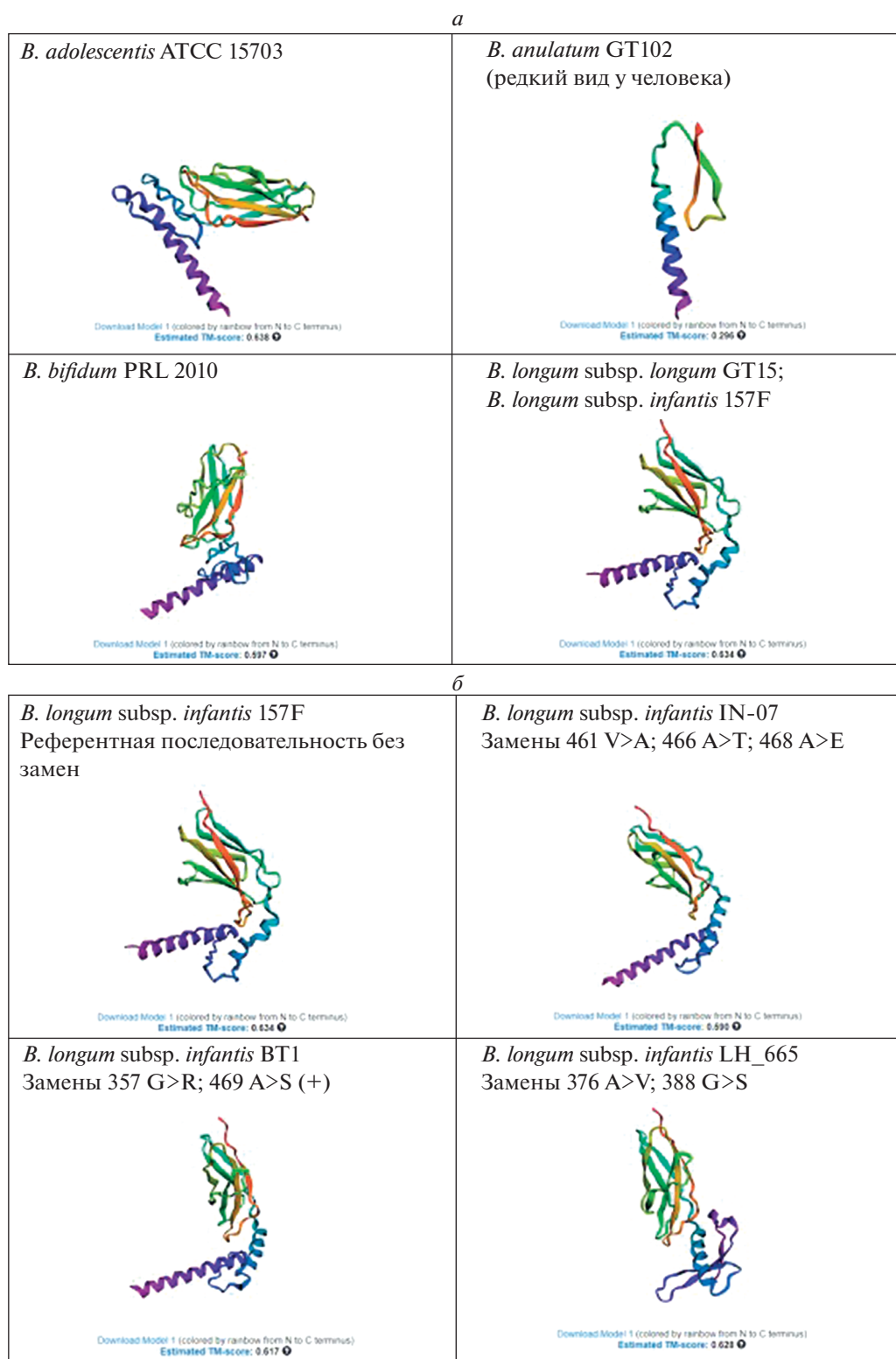


Рис. 2. *a* — предполагаемая пространственная структура ТМ и SCD Pkb2 у видов бифидобактерий, выделенных из микробиоты человека. *б* — предполагаемая пространственная структура ТМ и SCD Pkb2 *B. longum* subsp. *infantis* со спорадическими аминокислотными заменами, совпадающими с коровьими аминокислотами Pkb2.

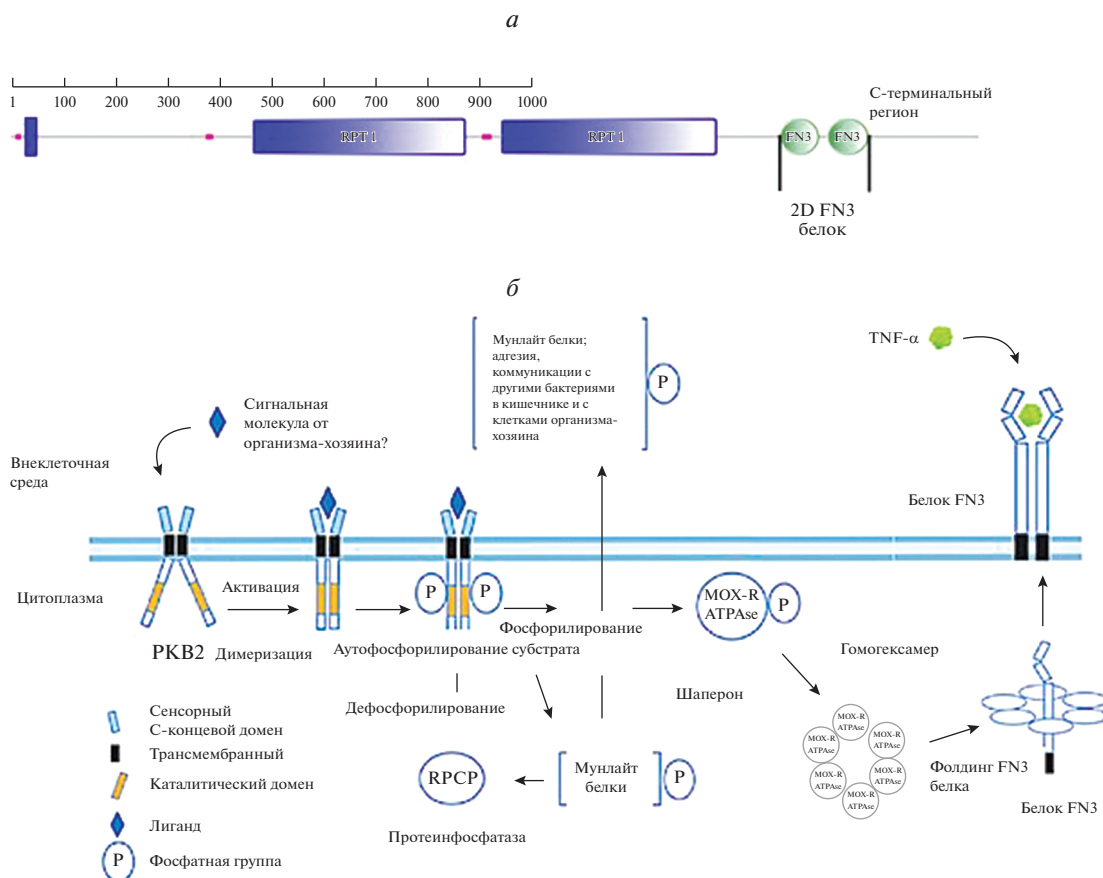


Рис. 3. *а* – белок FN3 штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15. Размер белка – 1994 а.о. Доменная структура белка: сигнальный пептид – 1–45 а.о.; трансмембранный регион – 29–51 а.о.; регион RPT1 (1) – 468–885 а.о.; регион RPT1 (2) – 951–1373 а.о.; первый домен FN3 – 1494–1581 а.о.; второй домен FN3 – 1586–1671 а.о.; С-терминальный регион – 1672–1994 а.о. Белок 2D FN3 – 1494–1671 а.о. *б* – гипотетическая схема механизма взаимодействия SCD Pkb2 и 2D FN3 с иммунной системой человека.

номах штаммов *B. longum* subsp. *longum* можно выделить четыре группы (табл. 2): группа 1.1 – не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом GT15; группа 1.2 – содержат замену 43 А→V; группа 1.3 – содержат две замены 43 А→V и 51 А→Т; группа 1.4 – содержат замену 111 Т→I.

Последовательности 2D FN3 штаммов *B. longum* subsp. *infantis* можно разделить на две группы: группа 2.1 – не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом ATCC 15697; группа 2.2 – содержат замену 15 N→D.

Последовательности 2D FN3 штаммов *B. adolescentis* можно разделить на четыре группы: группа 3.1 – не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом ATCC 15703; группа 3.2 – содержат замену 154 F→S; группа 3.3 – содержат две замены 123 N→D и 154 F→S; группа 3.4 – содержат три замены 123 N→D, 150 N→D и 154 F→S.

Последовательности 2D FN3 штаммов *B. angu-*
latum можно разделить на две группы: группа 4.1 –

не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом GT102; группа 4.2 – содержат три замены 97 Q→H, 170 S→A и 181 S→G. Последовательности 2D FN3 штаммов *B. dentium* можно разделить на две группы: группа 5.1 – не содержат аминокислотных замен по сравнению с референтным штаммом JCM 1195; группа 5.2 – содержат замену 132 D→G. Замены в коровых (консервативных) аминокислотах не обнаружены.

Последовательности 2D FN3 штаммов, относящиеся к видам *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense*, *B. gallicum* и *B. pseudocatenulatum*, не имели аминокислотных замен по сравнению с референтными штаммами LMG 11041, LMG 13208, LMG 11043, DSM 21854, LMG 11596 и LMG 10505 соответственно.

Составлен каталог сенсорных последовательностей 2D FN3 из геномов разных видов бифидобактерий, включающий последовательности, содержащие выявленные аминокислотные замены (табл. 2, Приложение, табл. 4).

Первый домен FN3

<i>B. angulatum</i>	PDAPSSIMRAQSCDGAIVLWVNFGRNGAEILEYEVHATGH--NTVSCGTDVCTIDLSNGROYHTTVARNDICWSAYSNTITATPDAP	90
<i>B. bifidum</i>	PGAPLLSPVSGQPADGSVNLSTWAGANGSPITDYEVWDG---GSKSCCAVITCOITGLTNGKEYSSTVKAKNEVGWSKPSSTSVKAMPDKV	89
<i>B. dentium</i>	PDAPLLSPIAGDAGCAVNLSTWAGSSNGSPITEYKVSMTDSSGEKSCGTVTTCQVTLTNGRKYSTVMACNEVGWSSPSNAVDGGQDKI	92
<i>B. adolescentis</i>	PDAPLLSAVSGDPDGAIVNLSTWAGSANGSPITEYKVMWGDASGERSCCQKTSCLIDELKNGKTYSEKVCARNEVGWSKDSNAVEGTPDKL	92
<i>B. pseudocatenulatum</i>	PDAPLLSPIAGDPDGAIVNLSTWAGSSNGSPITEYKVSMTDSSGEKSCGTVTTCQVTLTNGRKYSTVMACNEVGWSSPSNAVDGGQDKI	92
<i>B. catenulatum</i>	PDAPLLSPIAGDPDGAIVNLSTWAGSSNGSPITEYKVSMTDSSGEKSCGTVTTCQVTLTNGRKYSTVMACNEVGWSSPSNAVDGGQDKI	92
<i>B. kashiwanohense</i>	PDAPLLSPIAGDPDGAIVNLSTWAGSSNGSPITEYKVSMTDSSGEKSCGTVTTCQVTLTNGRKYSTVMACNEVGWSSPSNAVDGGQDKI	92
<i>B. breve</i>	PDAPLLSPIAGDPDGAIVNLSTWAGSSNGSPITEYKVSMTDSSGEKSCGTVTTCQVTLTNGRKYSTVMACNEVGWSSPSNAVDGGQDKI	92
<i>B. longum</i>	PEFPDLSVAGEPDSASVSTWTFCAANGSPITNRYVSWTCAATGEKDCCAVITSCQVTLTNGRKYSTVMACNEVGWSSPSNAVDGGQDKI	92
	* * * : : : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Второй домен FN3

<i>B. angulatum</i>	EGTEFLRLQATGGRNALHVTWPPSGSGSTAFAPTSYVTTLTSGDGRHEQOIEADALQASFOISDAMLASLSLFTVGVRASSAVSGNQASL	184
<i>B. bifidum</i>	PDPEKKVTEAGYQRVTVKWDVDPDYV---GTFKPSYVTTLTSGGGGVSVTKET--SGNSLVFPIDNSATGDTSYTATVKGKNGRAGEGQPSAA	176
<i>B. dentium</i>	PSAPQDVRAEANGNIVATSVPKGN---FSEVTEYEVTLTGDGVSK-KETT--SANAINFNLENNATIDGMSVSATVRAHNRVNWSPQSA	179
<i>B. adolescentis</i>	PDAPTDVTSVKGNTVSVTKAPDGN---FSSVNNMYEVLTLGGRNAPS-KQTT--NSTGIDFVEDNNAIFDGDYSYATVRAHKNVNWSPSKA	179
<i>B. pseudocatenulatum</i>	PDAPTDVKAESKNTITVTWKALEGN---FSAVDKYQVTLGSPNVANPAQEV--TGTSTIFKEDDNAITDGASYSYATVKAHKNVNWSPSTA	179
<i>B. catenulatum</i>	PDAPTDVKAESKNTITVTWKALEGN---FSAVDKYQVTLGSPNVANPAQEV--TGTSTIFKEDDNAITDGASYSYATVKAHKNVNWSPSTA	179
<i>B. kashiwanohense</i>	PDAPTDVKAESKNTITVTWKALEGN---FSAVDKYQVTLGSPNVANPAQEV--TGTSTIFKEDDNAITDGASYSYATVKAHKNVNWSPSTA	179
<i>B. breve</i>	PDAPTDVKAESKNTITVTWKALEGN---FSAVDKYQVTLGSPNVANPAQEV--TGTSTIFKEDDNAITDGASYSYATVKAHKNVNWSPSTA	179
<i>B. longum</i>	PSAPTDVTVTGGNKTAKTWKAPSGD---FSAVDNYSVTVTGAGAPQTKETG-NTATELSIFENNDISDGTATITVKAHKNVNWSPSTA	180
	* * : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : *	

Рис. 4. Выравнивание последовательностей двух FN3-доменов бифидобактерий из ЖКТ человека. Коровые аминокислоты выделены белыми буквами на черном фоне.

2.4. *Предсказание структур белков 2D FN3*
B. longum subsp. *longum* GT15, *B. bifidum* 791, *B. angulatum* GT102 и *B. adolescentis* ATCC 15703. С использованием Программы trRosetta были предсказаны 3D-структуры 2D FN3-белков штаммов *B. longum* subsp. *longum* GT15, *B. bifidum* 791, *B. angulatum* GT102 и *B. adolescentis* ATCC 15703 (рис. 5,а). Из рисунка видно, что все фрагменты белков образуют по два структурных элемента для первого и второго доменов FN3, в которых преобладают антипараллельные β-слои. Выявлены структурные отличия для 2D FN3-белков *B. bifidum* 791 и *B. angulatum* GT102 в сравнении со структурой 2D FN3-белка штамма *B. longum* GT15.

Также были выявлены структурные отличия для 2D FN3-белков из четырех групп штаммов *B. longum* subsp. *longum* (рис. 5,б).

3. Поиск и идентификация в российских метагеномах микробиоты здоровых детей и взрослых последовательностей, кодирующих SCD Pkb2 и 2D FN3

Последовательности, кодирующие SCD Pkb2 и 2D FN3, были выявлены в 11 из 23 метагеномов детей и в 34 из 38 метагеномов взрослых. Результаты анализа представлены на рис. 6 (а и б) и в Приложении, табл. 5 и 6. В изучаемых метагеномах не были обнаружены последовательности, соответствующие следующим видам бифидобактерий человека: *B. angulatum*, *B. breve*, *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum* subsp. *infantis*. В метагеномах детей, кроме того, отсутствовали последовательности, характерные для *B. bifidum* и *B. pseudocatenulatum*.

Анализ встречаемости групп штаммов (табл. 1), несущих аминокислотные замены в SCD Pkb2, в метагеномах российских жителей (рис. 6,а, Приложение, табл. 5) показал, что у подвида *B. longum* subsp. *longum* группа 1.1 очень редко встречается в изучаемых метагеномах и детей, и взрослых, хотя это самая распространенная группа у этого подвида (353 штамма из 535, имеющих секвенированные геномы); группа 1.2 не встречается в изучаемых метагеномах детей и очень редкая у взрослых; очень редкая у иностранных штаммов (8 штаммов из 535) группа 1.3 оказалась самой распространенной (около 55–65%) в изучаемых метагеномах российских жителей (детей и взрослых). У вида *B. adolescentis* группа 3.1 не встречается в исследуемых метагеномах ни у детей, ни у взрослых; является самой редкой группой среди всех известных в мире штаммов *B. adolescentis* (около 4%). Группа 3.2 встречается примерно в 30% изучаемых метагеномов детей и взрослых и у 20% иностранных штаммов; группы 3.3 и 3.4 не встречаются в исследуемых метагеномах детей; группа 3.3 встречается в 20–30% изучаемых метагеномов взрослых россиян и в геномах иностранных штаммов; группа 3.4 довольно редко встречается в метагеномах взрослых и в базах данных (менее 20%); группа 3.5 встречается в изучаемых метагеномах у детей и взрослых, а также у иностранных штаммов, редко (менее 15%). Группа 5.1 *B. animalis* subsp. *lactis* обнаружена в одном метагеноме ребенка и в двух метагеномах взрослых; группа 5.2 не встречается в изучаемых метагеномах. Группы 6.1, 6.2, 6.3 вида *B. bifidum* редко встречаются у взрослых, а группы 6.4 и 6.5 не обнаружены. У вида *B. pseudocatenulatum*

Таблица 2. Характеристика аминокислотных замен, обнаруженных в сенсорных последовательностях 2D FN3 бифидобактерий из ЖКТ человека

Вид <i>Bifidobacterium</i>	Группы по аминокислотным заменам	Название штамма	Наличие замен аминокислот		Ссылка на GenBank
			первый домен	второй домен	
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	1.1	GT15	Нет	Нет	AIW43408
	1.2	DSM 20219	43 A→V		SEB43038
	1.3	MCC10014	43 A→V 51 A→T		TCD94273
	1.4	MCC10099	Нет	111 T→I	TCF41702
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	2.1	ATCC 15697	Нет	Нет	BAJ69696
	2.2	LH_23	15 N→D		VWQ35166
<i>B. adolescentis</i>	3.1	ATCC 15703	Нет	Нет	BAF40092
	3.2	BIOML-A186		154 F→S	KAB5750345
	3.3	BIOML-A135		123 N→D 154 F→S	KAB5842581
	3.4	BIOML-A120		123 N→D 150 N→D 154 F→S	KAB5869187
<i>B. angulatum</i>	4.1	GT102	Нет	Нет	AMK57067
	4.2	LMG 11039		97 Q→H 170 S→A 181 S→G	KFI41277
<i>B. dentium</i>	5.1	JCM 1195	Нет	Нет	BAQ27672
	5.2	ATCC 27679	Нет	132 D→G	EFM42500

редко встречаются группы 7.2 и 7.3 у взрослых; группы 7.1 и 7.4 не обнаружены у взрослых.

Результат анализа встречаемости групп штаммов (табл. 2), несущих различные аминокислотные замены в сенсорном домене 2D FN3, у различных видов бифидобактерий показан на рис. 6, б и в Приложении, табл. 6. У детей и взрослых были выявлены гены, кодирующие 2D FN3 *B. adolescentis* (группа 3.3, часто встречается в базе данных и в 40% изучаемых метагеномов), *B. longum* subsp. *longum* (группа 1.4, встречается в 25% метагеномов и у 15–20% иностранных штаммов), *B. animalis* subsp. *lactis* и *B. catenulatum* и *B. pseudocatenulatum*. Только у взрослых были выявлены гены, кодирующие 2D FN3 *B. bifidum*, *B. adolescentis* (группа 3.2, встречается в 25% метагеномов, часто встречается в базе данных), *B. longum* subsp. *longum* (группы 1.1 и 1.3). Группа 1.1 встречается в 15% метагеномов взрослых россиян и среди иностранных штаммов. Группа 1.3 обнаружена у 50% штаммов в базе данных и в 30% метагеномов взрослых россиян. В исследуемых метагеномах здоровых детей и взрослых отсутствуют гены, кодирующие 2D FN3 *B. adolescen-*

tis (группы 3.1 и 3.4), *B. longum* subsp. *longum* (группа 1.2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленная работа является частью исследований по изучению роли оперона *PFNA* и кодируемых им белков в процессе взаимодействия бифидобактерий с иммунной системой человека.

Анализ аминокислотных последовательностей SCD Pkb2 и 2D FN3 изучаемых видов бифидобактерий человека подтвердил ранее полученные данные [17, 18], что последовательности очень консервативны внутри вида и сильно отличаются у разных видов. Несмотря на сильную межвидовую дивергенцию, у изучаемых видов бифидобактерий человека в последовательностях SCD Pkb2 и 2D FN3 обнаружены консервативные коровые аминокислоты (рис. 1 и 4). По-видимому, коровые аминокислоты важны для образования правильной пространственной структуры доменов, что обеспечивает нормальное функционирование доменов при связывании с лигандом (SCD Pkb2) или компонен-

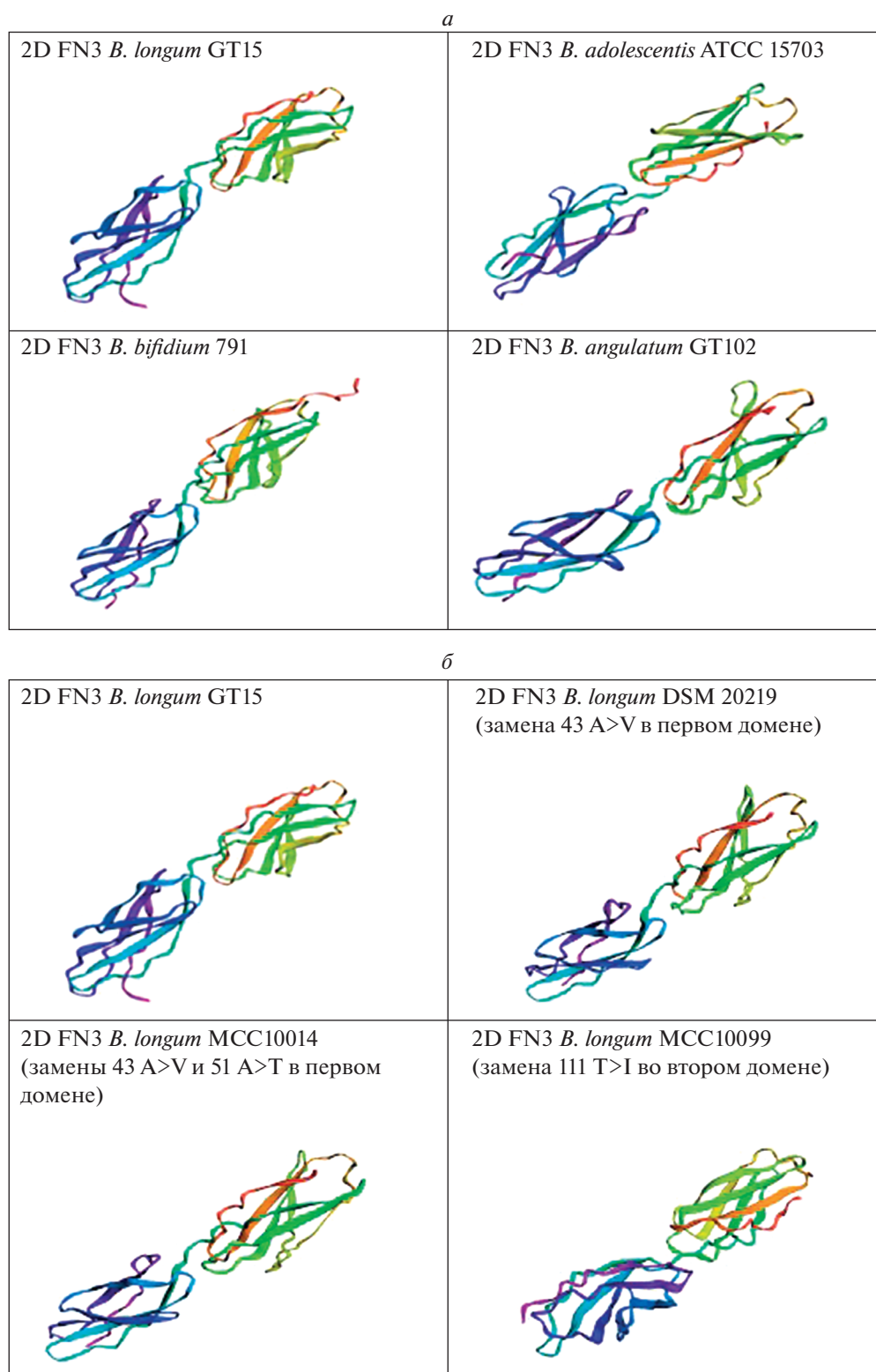


Рис. 5. Предсказание структур фрагментов 2D FN3-белков у бифидобактерий. *a* – структуры 2D FN3-белков штаммов *B. longum* subsp. *longum* GT15, *B. bifidum* 791, *B. angulatum* GT102 и *B. adolescentis* ATCC 15703; *б* – структуры 2D FN3-белков из четырех групп штаммов *B. longum* subsp. *longum*.

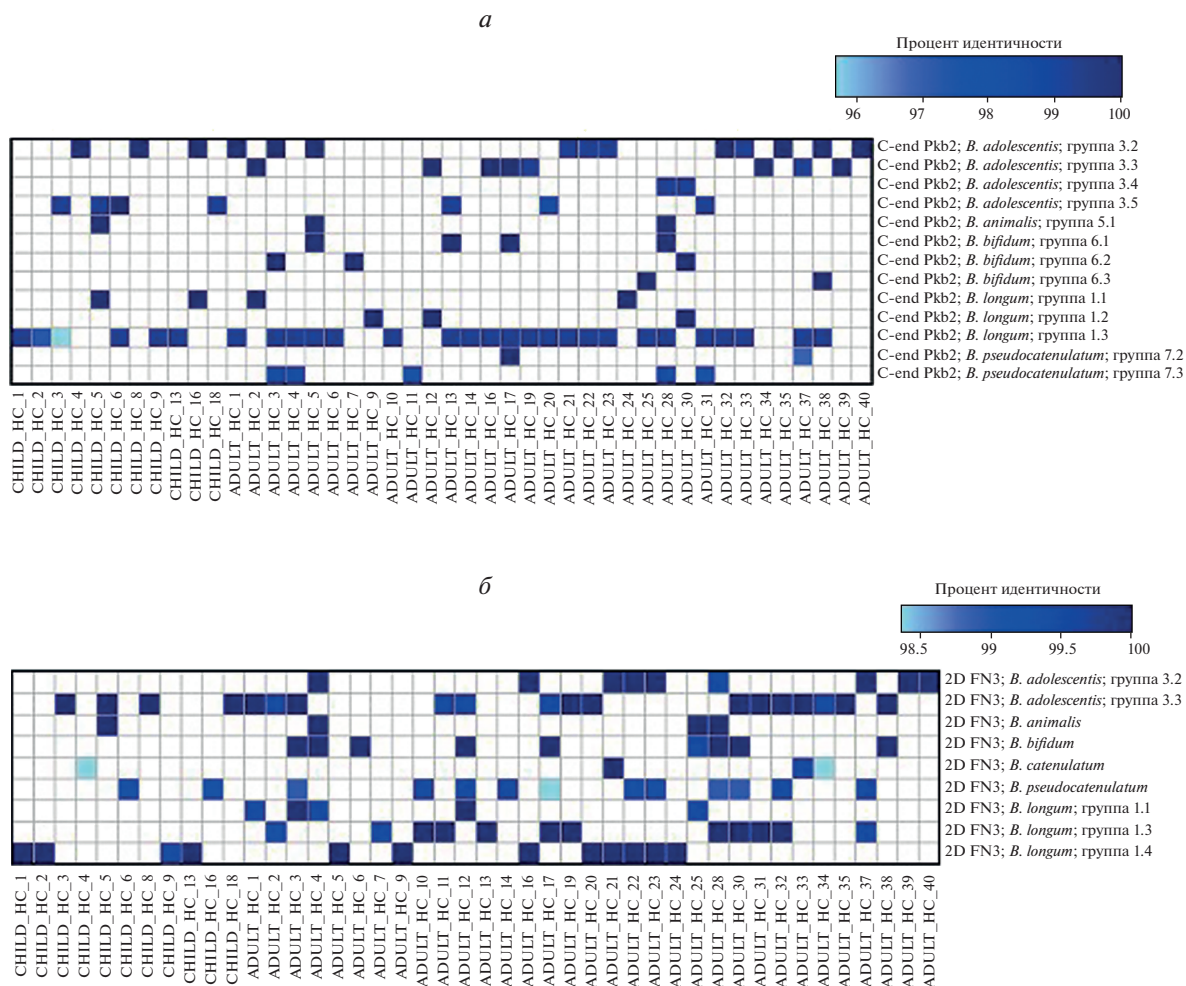


Рис. 6. Результаты поиска последовательностей SCD Pkb2 (а) и 2D FN3-сенсора (б) в микробиоте кишечника здоровых детей (“CHILD_HC”) и взрослых (“ADULT_HC”). На рисунках отражены только образцы, в которых нашлась хотя бы одна исследуемая последовательность, и белки, гомологи которых были выявлены как минимум в двух образцах. Цветовой градиент отображает процент идентичности между оригинальной последовательностью из каталога и найденным гомологом.

тами иммунной системы человека — цитокинами (2D FN3).

Изучение полиморфизма последовательностей SCD Pkb2 и 2D FN3 показало существование часто встречающихся аминокислотных замен, позволяющих внутри каждого изучаемого вида бифидобактерий разделить штаммы на несколько групп (кластеров) (табл. 1 и 2). В случае SCD Pkb2 у подвида *B. longum* subsp. *longum* выявились существенные популяционные различия в частоте встречаемости разных групп аминокислотных замен в российских метагеномах и у штаммов иностранного происхождения (рис. 6, а). Очень редкая в российских метагеномах группа 1.1 (табл. 1) является самой распространенной группой у этого подвида (353 штамма из 535, имеющих секвенированные геномы); очень редкая у иностранных штаммов (8 штаммов из 535) группа 1.3 оказалась самой

распространенной (около 55–65%) в метагеномах российских жителей (детей и взрослых). Возможно, наличие устойчивых кластеризующих замен и частоты их распределения в разных популяциях бифидобактерий связаны со специфичностью взаимодействия SCD Pkb2 с лигандом и 2D FN3 с цитокином и отражают гетерогенность популяции человека по иммунному статусу. Гипотетическая схема механизма взаимодействия SCD Pkb2 и 2D FN3 с иммунной системой человека представлена на рис. 3, б.

Предполагаемые пространственные структуры ТМ и SCD Pkb2 у трех основных видов бифидобактерий — обитателей ЖКТ человека: *B. adolescentis*, *B. bifidum* и *B. longum*, оказались похожи, в то время как у редкого для человека вида *B. angulatum* пространственная структура существенно отличается (рис. 2), что может указывать на воз-

можность связывания с различными лигандами. Выявлены структурные отличия для 2D FN3-белков *B. bifidum* и *B. angulatum* в сравнении со структурой 2D FN3-белка *B. longum* (рис. 5). Прогностическое построение пространственной структуры 2D FN3 из различных видов бифидобактерий позволило обнаружить в них потенциальные цитокин-связывающие карманы. Аминокислотные замены, особенно замены коровых аминокислот, могут приводить к изменению 3D-структуры доменов, что вызовет изменение специфичности связывания с различными лигандами или изменение эффективности связывания.

Полученные научные результаты помимо фундаментальной значимости представляют большой практический интерес. Различные виды бифидобактерий потенциально могут быть источником белков, селективно связывающихся с про- и противовоспалительными цитокинами человека. Это открывает огромные возможности для создания панели препаратов белков, способных регулировать уровень цитокинов в различных органах и тканях человека, подвергшегося воспалительным процессам.

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0092-2022-003, тема “Механизмы генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека”; “Микробиом кишечника человека: иммуномодулирующий и антиоксидантный потенциал”.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gao B., Gupta R.S. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum *Actinobacteria* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. V. 76(1). P. 66–112. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05011-11>
2. Sun Z., Zhang W., Guo C. et al. Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus *Bifidobacterium*: A snapshot of its genetic diversity and evolution // *PLoS One*. 2015. V. 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117912>
3. Duranti S., Longhi G., Ventura M. et al. Exploring the ecology of bifidobacteria and their genetic adaptation to the mammalian gut // *Microorganisms*. 2020. V. 9(1). P. 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010008>
4. Lugli G.A., Milani C., Duranti S. et al. Tracking the taxonomy of the genus *Bifidobacterium* based on a phylogenomic approach // *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84(4). <https://doi.org/10.1128/AEM.02249-17>
5. Turroni F., Peano C., Pass D.A. et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota // *PLoS One*. 2012. V. 7(5). P. e36957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036957>
6. Turroni F., Milani C., Duranti S. et al. Glycan utilization and cross-feeding activities by bifidobacteria // *Trends Microbiol.* 2018. V. 26(4). P. 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.001>
7. Wong C., Sugahara H., Odamaki T., Xiao J. Different physiological properties of human-residential and non-human-residential bifidobacteria in human health // *Benef. Microbes*. 2018. V. 9(1). P. 111–122. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0031>
8. Averina O.V., Ermolenko E.I., Yu A. et al. Influence of probiotics on cytokine production in the in vitro and in vivo systems // *Med. Immunology*. 2015. V. 17(5). P. 443–454. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-443-454>
9. Moriel D.G., Heras B., Paxman J.J. et al. Molecular and structural characterization of a novel *Escherichia coli* interleukin receptor mimic protein // *mBio*. 2016. V. 7(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02046-15>
10. Kumar H., Collado M.C., Wopereis H. et al. The bifidogenic effect revisited ecology and health perspectives of bifidobacterial colonization in early life // *Microorganisms*. 2020. V. 8(12). P. 1855. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121855>
11. Rabe H., Lundell A.-C., Sjöberg F. et al. Neonatal gut colonization by *Bifidobacterium* is associated with higher childhood cytokine responses // *Gut Microbes*. 2020. V. 12(1). P. 1–14. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1847628>
12. Dogra S.K., Dore J., Damak S. Gut microbiota resilience: definition, link to health and strategies for intervention // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572921>
13. Shang J., Wan F., Zhao L. et al. Potential immunomodulatory activity of a selected strain *Bifidobacterium bifidum* H3-R2 as evidenced in vitro and in immunosuppressed mice // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02089>
14. Wang Ya., Wu Y., Wang Yu. et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria // *Nutrients*. 2017. V. 9(5). P. 521. <https://doi.org/10.3390/nu9050521>
15. Högbom M., Ihalin R. Functional and structural characteristics of bacterial proteins that bind host cytokines // *Virulence*. 2017. V. 8. P. 1592–1601. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1363140>
16. Dyakov I.N., Mavletova D.A., Chernyshova I.N. et al. FN3 protein fragment containing two type III fibronectin domains from *B. longum* GT15 binds to human tumor necrosis factor alpha in vitro // *Anaerobe*. 2020. V. 65. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102247>
17. Nezametdinova V.Z., Zakharevich N.V., Alekseeva M.G. et al. Identification and characterization of the serine/threonine protein kinases in *Bifidobacterium* // *Arch. Microbiol.* 2014. V. 196. P. 125–136. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0949-8>

18. *Nezametdinova V.Z., Mavletova D.A., Alekseeva M.G. et al.* Species-specific serine-threonine protein kinase Pkb2 of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*: Genetic environment and substrate specificity // *Anaerobe*. 2018. V. 51. P. 26–35.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.003>
19. *Nezametdinova V.Z., Yunes R.A., Dukhinova M.S. et al.* The role of the PFNA operon of bifidobacteria in the recognition of host's immune signals: Prospects for the use of the FN3 protein in the treatment of COVID-19 // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22(17).
<https://doi.org/10.3390/ijms22179219>
20. *Andrews S.* FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available at <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
21. *Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30(15). P. 2114–P.2120.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
22. *Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P.* metaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler // *Genome Res.* 2017. V. 27(5). P. 824–834.
<https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>
23. *Boratyn G.M., Camacho C., Cooper P.S. et al.* BLAST: A more efficient report with usability improvements // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt282>
24. *Du Z., Su H., Wang W. et al.* The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction // *Nat. Protoc.* 2021. V. 16(12). P. 5634–5651.
<https://doi.org/10.1038/s41596-021-00628-9>
25. *Zakharevich N.V., Averina O.V., Klimina K.M. et al.* Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* GT15: Identification and characterization of unique and global regulatory genes // *Microb. Ecol.* 2015. V. 70(3). P. 819–834.
<https://doi.org/10.1007/s00248-015-0603-x>
26. *Zakharevich N.V., Nezametdinova V.Z., Averina O.V. et al.* Complete genome sequence of *Bifidobacterium angulatum* GT102: Potential genes and systems of communication with host // *Rus. J. Genet.* 2019. V. 55(7). P. 847–864.
<https://doi.org/10.1134/S1022795419070160>
27. *Turroni F., van Sinderen D., Ventura M.* Bifidobacteria: insights into the biology of a key microbial group of early life gut microbiota // *Microorganisms*. 2021. V. 7(11). P. 544.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7110544>
28. *Dogra S.K., Chung C.K., Wang D. et al.* Nurturing the early life gut microbiome and immune maturation for long term health // *Microorganisms*. 2021. V. 9(10). P. 2110.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9102110>

Species-Forming *PFNA* Operon in Bifidobacteria: Modules of Sensor Proteins Pkb2 and FN3, Structure and Distribution among Different Species and Strains of Bifidobacteria Derived from the Human Intestinal Microbiome

V. N. Danilenko^{a,*}, M. G. Alekseeva^a, T. A. Koshenko^a, A. S. Kovtun^a, and V. Z. Nezametdinova^a

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

*e-mail: valerid@vigg.ru

Recently, we discovered and thoroughly interrogated the species-specific (species-forming) PFNA operon in bifidobacteria. The *pkb2* and *fn3* making up the operon encode proteins that are possibly involved in the recognition of host signals. The *fn3* gene has been shown to encode a FN3 protein containing two fibronectin domains and cytokine receptor motifs. A fragment of this protein was shown to selectively bind to TNF α . The PFNA operon of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* GT15 regulates bidirectional communication with elements (cytokines) of the human immune system. In this study, using databases of sequenced genomes of bifidobacteria isolated from the microbiota of the human gastrointestinal tract, we studied the intraspecific polymorphism of the Pkb2 sensor C-terminal domain (SCD Pkb2-sensor C-end domain) and the FN3 protein fragment containing two FN3 domains (2D FN3). Significant non-recurring amino acid substitutions were found in the studied domains of each of the eight studied species of bifidobacteria of various geographic origins, making it possible to distinguish from 2 to 5 groups in each species of bifidobacteria. Using the trRosetta program, it was shown that the detected amino acid substitutions can lead to changes in the 3D structures of the analyzed domains. It is assumed that the detected clustering of strains may reflect the heterogeneity of Human-derived bifidobacteria, which were isolated from humans with different immune status. Catalogs of SCD Pkb2 and 2D FN3 proteins were put together, including significant amino acid substitutions in eight studied species belonging to four phylogenetic groups: *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* and *B. pseudolongum*. Using the previously developed algorithms and the created catalog, the occurrence of the studied groups of strains in the metagenomes of healthy residents of Moscow was established for two age categories: children 3–5 years old and adults over 18 years old. The developed approach is supposed to be used to study the correlation between the immune status and the presence in the microbiota of bifidobacteria strains belonging to specific groups clustered by amino acid substitutions in SCD Pkb2 and 2D FN3.

Keywords: gut microbiome, bifidobacteria, *PFNA* operon, SCD Pkb2 sensor protein, 2D FN3 sensor protein, receptors of immune system elements.