

Генетическое профилирование штаммов *Ligilactobacillus salivarius*, устойчивых к желчным кислотам

Хуснутдинова Д.^{1*}, Маркелова М.¹, Синягина М.¹, Сенина А.¹, Булыгина Е.¹,
Абдулхаков С.^{1,2}, Григорьева Т.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

* dilyahusn@gmail.com

Ключевые слова: *Ligilactobacillus salivarius*; желчные кислоты; болезнь Крона; полногеномное секвенирование

Мотивация и цель: Микробиота кишечника принимает непосредственное участие в биотрансформации желчных кислот с помощью микробных ферментов. Одним из этапов метаболизма желчных кислот является деконъюгация первичных желчных кислот с помощью бактериальных гидролаз желчных кислот (BSH). Лактобациллы, в частности *L. salivarius*, принимают активное участие в данных процессах и обладают большим количеством генов глицин- и таурин-гидролаз [1, 2]. Кишечник пациентов с болезнью Крона, помимо характерного дисбиоза, имеет в составе большое количество желчных кислот, в особенности конъюгированных [3–5]. В связи с этим целью работы было сравнить желчеустойчивость и генетический потенциал штаммов *L. salivarius*, выделенных от пациентов с болезнью Крона и здоровых добровольцев.

Методы и алгоритмы: Объектом исследования были штаммы *L. salivarius*: 3 – выделенные из микробиоты кишечника пациентов с болезнью Крона, 4 – выделенные от здоровых добровольцев и 1 – из пробиотического препарата OMNI-biotic (AllergoSan, Германия). Для оценки желчеустойчивости культуры выращивали при 37 °C на среде Man–Rogosa–Sharpe (MRS) с бычьей желчью в концентрациях: 0.3 %, 0.5 %, 1.0 %, 1.5 %, 5.0 %, 7.5 %. Устойчивость оценивали по изменению оптической плотности бактериальной культуры через 4, 24 и 48 часов. Выделение геномной ДНК проводили с использованием набора ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, США) с модификациями. Подготовку библиотек ДНК осуществляли с использованием набора NEBNext Ultra II для Illumina (New England BioLabs, США) согласно рекомендациям производителя. Секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq (в режиме 2*300 п.н.).

Результаты: Штаммы *L. salivarius*, выделенные от пациентов с болезнью Крона, не отличаются по желчеустойчивости от штаммов здоровых добровольцев и пробиотического штамма при выбранных концентрациях (до 7.5 % желчи).

Согласно результатам полногеномного анализа, геномы штаммов *L. salivarius*, выделенные от пациентов с болезнью Крона и от здоровых добровольцев, имеют один общий ген *bsh*, кодирующий холоилглицингидролазу – WP_014568264.1 (табл. 1), однако по второму гомогичному гену *bsh* штаммы отличаются. Штаммы, выделенные от здоровых добровольцев, обладают одним общим мотивом белка, а штаммы от пациентов с болезнью Крона – другим, WP_003699092.1.

Пробиотический штамм *L. salivarius* Di6 обладает двумя гомологичными генами *bsh* (WP_034983830.1; WP_032494132.1), однако они отличаются от генов в штаммах, выделенных от участников исследования.

Таблица 1. Гены *bsh*, обнаруженные в штаммах *L. salivarius*

Группа	Штамм	Продукт	№ RefSeq
Здоровые добровольцы	A5-1-10	белок семейства холоилглицингидролаз	WP_014568264.1
		холоилглицингидролаза	protein motif:HMM:NF038245.1“ /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology"
	A5-2-10	белок семейства холоилглицингидролаз	WP_014568264.1
		холоилглицингидролаза	protein motif:HMM:NF038245.1““ /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology"
	A7-1-15	белок семейства холоилглицингидролаз	WP_014568264.1
		холоилглицингидролаза	protein motif:HMM:NF038245.1““ /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology"
	A7-2-5	белок семейства холоилглицингидролаз	WP_014568264.1
		холоилглицингидролаза	protein motif:HMM:NF038245.1““ /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology"
Пациенты с болезнью Крона	198vzk-4	белок семейства холоилглицингидролаз	WP_014568264.1
		холоилглицингидролаза	WP_003699092.1
	144-2021-8	холоилглицингидролаза	WP_003699092.1
		белок семейства холоилглицингидролаз	WP_014568264.1
	098-2021-6	белок семейства холоилглицингидролаз	WP_014568264.1
		холоилглицингидролаза	WP_003699092.1
Пробиотический штамм	Di6	холоилглицингидролаза	WP_034983830.1
		холоилглицингидролаза	WP_032494132.1

Выводы: Обнаружены различия в структуре генов *bsh* – гидролаз желчных кислот, которые не связаны с устойчивостью *L. salivarius* к желчным кислотам. Вероятно, данные различия могут обеспечивать субстратную специфичность к глицин- и/или таурин-конъюгированным желчным кислотам.

Финансирование: Работа выполнена на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (проект № FZSM-2023-0013).

Genetic profiling of strains of *Ligilactobacillus salivarius* resistant to bile acid

Khusnutdinova D.^{1*}, Markelova M.¹, Siniagina M.¹, Senina A.¹, Boulygina E.¹, Abdulkhakov S.^{1,2}, Grigoryeva T.¹

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

* dilyahusn@gmail.com

Key words: *Ligilactobacillus salivarius*; bile acids; Crohn's disease; whole genome sequencing

Motivation and Aim: The gut microbiota is directly involved in the biotransformation of bile acids through microbial enzymes. One step in bile acid metabolism is the deconjugation of primary bile acids by bacterial bile acid hydrolases (BSH). *Lactobacillaceae*, particularly *L. salivarius*, play an active role in these processes and have a large number of glycine and taurine hydrolase genes [1, 2]. In addition to the specific dysbiosis, the intestines of patients with Crohn's disease contain high levels of bile acids, particularly conjugated bile acids [3–5]. The aim of the study was to compare the resistance to bile in various concentrations and to assess genetic potential of *L. salivarius* strains isolated from patients with Crohn's disease and healthy volunteers. **Methods and Algorithms:** The objects of the study were *L. salivarius* strains: 3 – isolated from the intestinal microbiota of patients with Crohn's disease, 4 – isolated from healthy volunteers and 1 – from probiotic OMNI-biotic (AllergoSan, Germany). To assess bile resistance, bacterial cultures were grown at 37 °C on Man–Rogosa–Sharpe (MRS) medium with bovine bile in concentrations: 0.3 %; 0.5 %; 1.0 %; 1.5 %; 5.0 %; 7.5 %. The Resistance was determined according to changes in optical density after 4, 24 and 48 hours of culturing. Genomic DNA was extracted from strains using the ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, USA) with modifications. DNA libraries were prepared using the NEBNext Ultra II kit for Illumina (New England BioLabs, USA). Sequencing was performed on an Illumina MiSeq platform (2*300 bp mode).

Results: *L. salivarius* strains isolated from patients with Crohn's disease do not differ in bile resistance from strains from healthy patients and from the probiotic strain at tested concentrations (up to 7.5 % bile).

According to genome-wide analysis, the genomes of *L. salivarius* strains isolated from both Crohn's disease patients and healthy volunteers have the same *bsh* gene encoding choloylglycine hydrolase – WP_014568264.1 (Table 1), but the strains differ in the second homologous *bsh* gene. The Strains isolated from healthy volunteers have one common protein motif and the strains from Crohn's disease patients have another one – WP_003699092.1.

The probiotic strain *L. salivarius* Di6 has two homologous *bsh* genes (WP_034983830.1; WP_032494132.1), but they differ from the genes in the strains isolated from the study participants.

Table 1. *bsh* genes found in *L. salivarius* strains

Group	Strain	Product	№ RefSeq
Healthy volunteers	A5-1-10	choloylglycine hydrolase family protein	WP_014568264.1
		choloylglycine hydrolase	protein motif:HMM:NF038245.1" /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology"
	A5-2-10	choloylglycine hydrolase family protein	WP_014568264.1
		choloylglycine hydrolase	protein motif:HMM:NF038245.1" /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology"
	A7-1-15	choloylglycine hydrolase family protein	WP_014568264.1
		choloylglycine hydrolase	protein motif:HMM:NF038245.1" /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology"
	A7-2-5	choloylglycine hydrolase family protein	WP_014568264.1
		choloylglycine hydrolase	protein motif:HMM:NF038245.1" /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology"
Crohn's disease patients	198vzk-4	choloylglycine hydrolase family protein	WP_014568264.1
		choloylglycine hydrolase	WP_003699092.1
	144-2021-8	choloylglycine hydrolase	WP_003699092.1
		choloylglycine hydrolase family protein	WP_014568264.1
	098-2021-6	choloylglycine hydrolase family protein	WP_014568264.1
		choloylglycine hydrolase	WP_003699092.1
Probiotic	Di6	choloylglycine hydrolase	WP_034983830.1
		choloylglycine hydrolase	WP_032494132.1

Conclusion: We found the differences in the structure of the *bsh* genes – bile acid hydrolases which are not related to the resistance of *L. salivarius* to bile acids. It is likely that these differences confer a substrate specificity for glycine and/or taurine conjugated bile acids.

Funding: The work was carried out on the basis of the Interdisciplinary Center for Collective Use of Kazan Federal University within the framework of the Strategic Academic Leadership Program of the Kazan Federal University (PRIORITY-2030) and was financed by a subsidy allocated to the Kazan Federal University for the implementation of the state assignment in the field of scientific activity (project No. FZSM-2023-0013).

Список литературы/References

1. Babu A.F. et al. Identification and distribution of sterols, bile acids, and acylcarnitines by LC-MS/MS in humans, mice, and pigs-a qualitative analysis. *Metabolites*. 2022;12(1):49
2. Li C.Y. et al. Discovery and characterization of naturally occurring chalcones as potent inhibitors of bile salt hydrolases. *Acta Mater Med*. 2022;1(2):169-176
3. Gadaleta R.M. et al. Bile salt hydrolase-competent probiotics in the management of IBD: unlocking the “Bile acid code”. *Nutrients*. 2022;14(15):3212
4. Fitzpatrick L.R., Jenabzadeh P. IBD and bile acid absorption: focus on pre-clinical and clinical observations. *Front Physiol*. 2020;11:564
5. Thomas J.P. et al. The emerging role of bile acids in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Front Immunol*. 2022;13:246