DOI: 10.11134/btp.4.2026.2

UDC: 579.61

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ *BACTEROIDES FRAGILIS* В УСЛОВИЯХ АНТИБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Атавлиева С.Ш.[1,2*], Конарбаева А.А.[1], Ауганова Д.Н.[1], Бекбаева А.[1,2], Кожахметова С.С.[1], Тарлыков П.В.[1]

[1]*Национальный центр биотехнологии, 010000, Казахстан, г. Астана, Кургальжинское шоссе 13/5*
[2]*Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, 010008, Казахстан, г. Астана, ул. Сатпаева, 2*
**atavliyeva@biocenter.kz*

АБСТРАКТ

Высокая устойчивость *Bacteroides fragilis* к антибиотикам и его способность совмещать симбиоз и патогенность в организме человека делают этот вид ключевой моделью для изучения стресс-ответа бактерий. Везикулы наружной мембраны (ВНМ), секретируемые грамотрицательными бактериями, играют ключевую роль в межклеточной коммуникации, патогенезе и адаптации к антибиотикам. В данной работе проведён протеомный анализ ВНМ *B. fragilis* при воздействии меропенема с использованием LC-MS/MS и безметочного количественного анализа (LFQ). Выявлено 19 дифференциально экспрессированных белков, относящихся к основным функциональным группам: ферменты аминокислотного и углеводного метаболизма, белки антиоксидативной защиты, факторы репликации и трансляции, а также метилтрансферазы. Совокупность этих изменений отражает перераспределение метаболических потоков в сторону поддержания энергетического баланса и антиоксидантной защиты в условиях антибиотического стресса. Таким образом, протеомный профиль ВНМ *B. fragilis* демонстрирует их значимую роль в механизмах выживания и устойчивости бактерии, а также подчёркивает потенциальное участие в патогенезе.

Ключевые слова: *Bacteroides fragilis*, внеклеточные мембранные везикулы, антибиотикорезистентность, протеомика, меропенем, стресс-ответ бактерий.

ВВЕДЕНИЕ

Bacteroides fragilis облигатный анаэроб и один из наиболее распространённых представителей микробиоты кишечника человека [1]. В нормальных условиях он выполняет важные функции в поддержании метаболического баланса кишечника, однако при нарушении микробного гомеостаза и ослаблении иммунной защиты способен вызывать тяжёлые инфекции, включая внутрибрюшные абсцессы. Особенностью *B. fragilis* является высокая устойчивость к β-лактамным антибиотикам, включая карбапенемы, что затрудняет терапию и подчёркивает необходимость изучения механизмов его адаптации к стрессу [2].

Везикулы наружной мембраны (ВНМ) — универсальный механизм коммуникации грамотрицательных бактерий. Они представляют собой сферические образования наружной мембраны, служат для переноса факторов вирулентности, ферментов и регуляторных молекул. ВНМ обеспечивают взаимодействие бактерий с окружающей средой, способствуют выживанию при стрессовых условиях и играют важную роль в патогенезе [3]. *Bacteroides fragilis* подразделяется на нетоксигенные (NTBF) и энтеротоксигенные штаммы (ETBF). NTBF составляют большинство изолятов и выполняют полезные функции в кишечнике, включая деградацию полисахаридов и поддержание микробного баланса. ETBF несут остров патогенности (BfPAI), кодирующий цинк-зависимую металлопротеазу (токсин BFT), который разрушает E-кадгерин эпителия и активирует провоспалительные сигнальные пути [4].

Секреция ВНМ *B. fragilis*, особенно у токсигенных штаммов, ассоциирована с переносом ферментов и факторов вирулентности, а также с включением систем антиоксидантной защиты. Такие везикулы могут функционировать как метаболически активные структуры, повышающие устойчивость к стрессу и антибиотикам, что подтверждается наблюдением увеличенной продукции ВНМ в условиях воздействия желчных солей и антибактериальных препаратов [5]. Показано, что ВНМ *B. fragilis* обладают более выраженной способностью активировать рецепторы врожденного иммунитета (TLR2, TLR4, TLR7/8, TLR9, NOD1), чем целые бактериальные клетки, что связано с обогащением ВМН ЛПС, пептидогликаном, белками и нуклеиновыми кислотами [6]. Такой механизм позволяет рассматривать ВНМ как ключевые медиаторы иммунной активации при взаимодействии *B. fragilis* с клетками хозяина.

Однако существующие протеомные исследования преимущественно сосредоточены на различиях между NTBF и ETBF штаммами, оставляя значительный пробел в понимании специфических механизмов белковой адаптации к антибиотическому стрессу у NTBF. Для решения этой задачи в настоящем исследовании будет применен высокочувствительный масс-спектрометрический анализ LC-MS/MS с безметочным количественным определением (label-free quantification, LFQ), который позволит выявить динамические изменения протеома ВНМ, критические белки стресс-ответа, механизмы их селективной упаковки в везикулы и роль в формировании резистентности. В настоящем исследовании использовался нетоксигенный штамм *B. fragilis*, что позволяет сосредоточиться на механизмах стресс-ответа и антибиотикоустойчивости, не связанных напрямую с токсигенностью.

Целью данного исследования было провести протеомный анализ ВНМ *Bacteroides fragilis* в условиях антибиотического стресса (меропенем), с последующей идентификацией белков, участвующих в метаболизме, стресс-ответе и потенциально связанных с патогенезом.

DOI: 10.11134/btp.4.2026.2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальная культура и условия выращивания

Штамм *B. fragilis* BFR KZ01 (BioProject PRJNA531645, SRA: SRX22081155) выращивали в жидкой питательной среде Brain Heart Infusion Broth (HiMedia) при анаэробных условиях при температуре 37°C 24 ч, что является исходной точкой. Для моделирования стрессовых условий культуру инкубировали в присутствии меропенема (1 мкг/мл). Согласно экспериментальной схеме (Рис. 1) были получены 4 серии поколений MEM1-MEM4, культивирование проводилось с последовательным добавлением каждые 48 часов 1 мкг/мл меропенема. После отмены антибиотика на 8 сутки была отобрана культура wMEM4. Всего было собрано пять точек для выделения белков из наружных мембранных везикул *Bacteroides fragilis*.

Выделение наружных мембранных везикул

ВНМ выделяли из жидкой культуры бактерий с использованием ExoBacteria™ OMV Isolation Kit (cat. EXOBAC100A-1) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные везикулы использовали для последующего протеомного анализа.

Электрофорез и трипсинолиз белков в геле

После выделения белки концентрировали с помощью колонок Amicon ultra (10kDa), далее концентрация белков была измерена на флуориметре Qubit (Thermo). Белки ресуспендировали в буфере NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen), содержащем 50 мМ DTT. Белковую фракцию разделяли на градиентном геле NuPAGE 4–12% Bis-Tris Mini Protein Gel (Invitrogen). Перед электрофорезом образцы инкубировали при 95°C в течение 5 мин. Электрофорез проводили при 150 V в течение 1 часа. Гели окрашивали с использованием **PageBlue Protein Staining Solution (Thermo). Белковые полосы** вырезали для дальнейшей обработки.

Каждую дорожку геля, соответствующую образцам (MEM1, MEM2, MEM3, MEM4, wMEM4), разделяли на пять фрагментов длиной примерно 1 см с использованием одноразовых скальпелей и переносили в микропробирки. Фрагменты геля инкубировали в растворе 100 мМ бикарбоната аммония и 100 % ацетонитрила. Для восстановления дисульфидных связей добавляли 5 мМ DTT и инкубировали при 60°C в течение 10 мин. Алкилирование проводили с использованием 100 мМ йодацетамида при 37 °C в течение 10 мин. После этого супернатант удаляли, а кусочки геля трижды промывали раствором 50 мМ бикарбоната аммония и 100 % ацетонитрила с инкубацией по 5 мин при 37 °C.

После восстановления и алкилирования кусочки геля подвергали триптическому гидролизу в течение ночи при 37 °C (10нг/мкл трипсина, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Полученные пептиды очищали на C18-колонке (C18 Tips, Thermo), элюировали и концентрировали для анализа методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS).

Жидкостная хроматография и масс-спектрометрия (LC-MS/MS)

Пептидные смеси анализировали методом ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) на приборе Impact II (Bruker). Разделение проводили в градиенте ацетонитрила, содержащего 0,1% TFA. Детекцию выполняли в режиме data-dependent acquisition. Пептидные смеси анализировали с использованием системы наножидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (nanoLC-MS/MS) в режиме обращённо-фазовой хроматографии на колонке C18. Хроматографическое разделение проводили на системе Dionex nanoHPLC (Thermo) с использованием улавливающей колонки Acclaim PepMap 100 C18 (Thermo) и аналитической колонки Acclaim PepMap RSLC (Thermo). Разделение осуществляли в градиенте ацетонитрила продолжительностью 75 мин при скорости потока 0,3 мкл/мин. Ионизацию осуществляли с использованием не модифицированного источника Captive Spray (напряжение капилляра 1300 V, поток сухого газа 3,0 л/мин, температура 150 °C), соединённого с масс-спектрометром Impact II ESI-QUAD-TOF (Bruker). Полные MS-спектры регистрировали со скоростью 2,0 Гц, далее автоматически собирали MS/MS-спектры.

Биоинформатическая обработка и квантификация белков

Сырые файлы масс-спектрометрии анализировали с помощью программного обеспечения **PEAKS Studio (Bioinformatics Solutions Inc.)**. Для анализа в **PEAKS Studio** допуск по массе прекурсоров был установлен на ±100 ppm, а для фрагментных ионов — ±0,05 Da. В каче-



Рисунок 1. Экспериментальная схема культивирования *Bacteroides fragilis* и выделения ВНМ в условиях антибиотического стресса.
B. fragilis культивировали 24 часа (Bf.1, синий), затем добавляли меропенем (1 мкг/мл) и инкубировали 48 часов с отбором четырех образцов (MEM1-4, красные). После отмены антибиотика бактерии переносили в свежую среду и культивировали 8 суток с финальным отбором образца (WMEM4, зеленый).

DOI: 10.11134/btp.4.2026.2

стве фермента использовался трипсин с разрешением до двух пропущенных сайтов расщепления. В качестве фиксированной модификации учитывалось карбамидометилирование цистеина, переменными модификациями были окисление метионина. Для идентификации пептидов уровень FDR был установлен на 1,0%, при этом белки считались достоверными при наличии как минимум двух уникальных пептидов. Поиск выполнялся по FASTA-файлу базы UniProt для *Bacteroides fragilis* (UP000006731). Количественный анализ проводился методом **LFQ** в PEAKS Studio с использованием функции *Match between runs* (Directed Feature Alignment). Допуск по массе составлял 20 ppm, временное окно удерживания - 2 минуты. Для статистической обработки применяли тест ANOVA; значимыми считались изменения с FDR ≤ 0,01.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании использовался штамм *Bacteroides fragilis* с множественной лекарственной устойчивостью BFR KZ01 (BioProject PRJNA531645, SRA: SRX22081155). Этот штамм проявляет устойчивость к метронидазолу, тетрациклину и ципрофлоксацину. Изолят был получен от 48-летнего мужчины с диагнозом острый гангренозный перфоративный аппендицит, осложненный перитонитом [7].

Клетки культивировали в присутствии и в отсутствие меропенема (Рис. 1). Были получены серии культур, включающие начальную точку (B.f1), образцы после инкубации с антибиотиком (B.f1 MEM1–MEM4) и образцы после отмены антибиотика (B.f1 WM1–WM4). Для протеомного анализа были выбраны пять временных точек: **MEM1, MEM2, MEM3, MEM4** (первые четыре поколения на фоне антибиотика) и **wMEM4** (культура после отмены антибиотика на 8 сутки). Схема эксперимента представлена на Рисунке 1.

Для оценки изменений протеома *B. fragilis* в условиях антибиотического стресса был проведён безметочный количественный анализ экспрессии белков (LFQ) после SDS-PAGE разделения и LC-MS/MS анализа. Сравнение протеомных профилей между культурами, инкубированными с меропенемом (MEM1–MEM4), и культурой после отмены антибиотика (wMEM4) выявило статистически значимые различия в экспрессии 19 белков ($p < 0.05$, FDR ≤ 0.01). Среди дифференциально экспрессированных белков были идентифицированы ферменты, участвующие в метаболизме и энергетическом обмене, белки антиоксидантной защиты, а также компоненты, связанные с процессами репликации, транскрипции и трансляции (Таблица 1). Кроме того, во внеклеточных мембранных везикулах обнаружены белки пептидного обмена и четыре неохарактеризованных белка.

UniProt ID	Ген	Название белка	Изменение экспрессии (fold change)/log2FC	Функциональная категория
Q5LBG2	kbl	2-амино-3-кетобутират-КоА-лигаза	-	Метаболизм и энергетический обмен
Q5LD58	glyA	Серин-гидроксиметилтрансфераза	-	Метаболизм и энергетический обмен
Q5LHC7	pepD_2	Аминоацил-гистидин дипептидаза	18.64/4.22	Метаболизм и энергетический обмен
Q5LBT1	glyA	Гликогенфосфорилаза	-	Метаболизм и энергетический обмен
Q5L923	tpiA	Триозофосфатизомераза	-	Метаболизм и энергетический обмен
Q5LB89	pfkA	Пирофосфат–фруктозо-6-фосфат-1-фосфотрансфераза	-	Метаболизм и энергетический обмен
Q5L8Z8	mdh	Малатдегидрогеназа	23.08/4.53	Метаболизм и энергетический обмен
Q5L9J7	icd	Изоцитратдегидрогеназа	-	Метаболизм и энергетический обмен
Q5LAD5	purA	Аденилосукцинатсинтаза	13.48/3.75	Нуклеотидный обмена и метилирование
Q5LGP9	rlmI	SAM-зависимая метилтрансфераза	-	Нуклеотидный обмена и метилирование
A0A380Z107	yfeX	Пероксидаза DyP	-	Антиоксидантная защита
Q5LGP4	trxB	Тиоредоксин-редуктаза	-	Антиоксидантная защита
Q5LBG9	dnaN	Бета-скользящий зажим	35.14/5.13	Репликация и трансляция
Q5LGN8	rpsA	Рибосомный белок S1	-	Репликация и трансляция
Q5LGL0	BF9343_0948	Неохарактеризованный белок	-	Неохарактеризованный
Q5LGK9	BF9343_0949	Неохарактеризованный белок	-	Неохарактеризованный
Q5LH17	BF9343_0788	Неохарактеризованный белок	-	Неохарактеризованный
Q5LCH1	BF9343_2413	Неохарактеризованный белок	-	Неохарактеризованный
Q5LBT1	BF9343_2656	Неохарактеризованный белок	-	Неохарактеризованный

DOI: 10.11134/btp.4.2026.2

Таблица 1. Дифференциально экспрессированные белки во внеклеточных мембранных везикулах *Bacteroides fragilis* при воздействии меропенема. «–» белок детектирован исключительно в условиях воздействия меропенема, отсутствовал в образце после отмены антибиотика (WM4).

Белки метаболизма и энергетического обмена

Катаболизм аминокислот и пептидный обмен

В протеоме OMV *B. fragilis* при антибиотическом стрессе были выявлены ферменты катаболизма аминокислот. Так, **2-амино-3-кетобутират-КоА-лигаза (KBL)** катализирует образование ацетил-КоА и глицина из треонина, связывая аминокислотный обмен с энергетическим метаболизмом [8]. Связанный с этим процессом фермент серин-гидроксиметилтрансфераза **(SHMT)** обеспечивает превращение серина и глицина в одноуглеродные единицы (5,10-метилен-THF), необходимые для синтеза пуринов и тимидилата [9]. Совместное присутствие KBL и SHMT отражает вовлечение катаболизма аминокислот в поддержание энергетического и нуклеотидного обмена в условиях антибиотического стресса. Дополнительно, в ВНМ был обнаружен фермент аминоацил-гистидин дипептидаза **(PepD)** у грамотрицательных анаэробов, таких как *Bacteroides fragilis*, дипептидазы катализирует гидролиз разнообразных дипептидов с образованием аминокислот, которые служат источником азота и энергии для клетки. Подобные механизмы подробно описаны у близкородственного патогена *Porphyromonas gingivalis*, где экзопептидазы и транспортеры дипептидов критически важны для роста и вирулентности [10]. Функционально **PepD** белок связан с **SHMT и KBL, а также с путями** с путями энергетического метаболизма (гликолиз и цикл трикарбонавых кислот (TCA)), куда поступают продукты аминокислотного распада.

Гликолиз и энергетика

В протеоме ВНМ *B. fragilis* были выявлены ферменты, объединяющие процессы гликолиза и TCA. К ферментам, участвующим в гликолизе и мобилизации углеводов, относятся гликогенфосфорилаза, триозофосфатизомераза и пирофосфат–фруктозо-6-фосфат-1-фосфотрансфераза. Гликогенфосфорилаза (GlgP) у бактерий катализирует фосфоролитическое расщепление гликогена до глюкозо-1-фосфата, обеспечивая быстрый доступ к резервным углеводам. Эта стратегия играет ключевую роль в выживании микроорганизмов в условиях стресса и дефицита питательных веществ, включая стационарную фазу и воздействие антибиотиков [11]. Триозофосфатизомераза (TPI) — высококонсервативный фермент гликолиза, катализирующий взаимопревращение дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата [12]. Пирофосфат–фруктозо-6-фосфат-1-фосфотрансфераза **(PPi-PFK)** является также ферментом гликолиза, катализирующий фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с использованием пирофосфата (PPi) вместо АТФ. В отличие от классической АТФ-зависимой фосфофруктокиназы (ATP-PFK), реакция с участием PPi-PFK является обратимой и может функционировать как в гликолизе, так и в глюконеогенезе [13]. Наличие гликогенфосфорилазы (GlgP) свидетельствует об активации резервных источников энергии за счёт мобилизации запасённых углеводов, тогда как триозофосфатизомераза (TPI) поддерживает эффективность углеродного потока, а PPi-PFK обеспечивает его обратимость и адаптивность. Совокупно эти ферменты отражают сохранение ключевых функций гликолиза, направленных на формирование метаболитов для цикла трикарбоновых кислот (TCA).

Ключевые ферменты TCA, малатдегидрогеназа (MDH) и изоцитратдегидрогеназа [NADP] (IDH), обеспечивают образование восстановительных эквивалентов (NADH, NADPH) и энергетических метаболитов. Малатдегидрогеназа (MDH) является NAD^+-зависимым ферментом цикла трикарбоновых кислот, катализирующим обратимую реакцию превращения малата в оксалоацетат с образованием NADH. Этот фермент играет ключевую роль в энергетическом метаболизме и поддержании редокс-баланса клетки. Классические биохимические исследования показали, что MDH активно экспрессируется во всех штаммах *Bacteroides fragilis*, что подчёркивает его фундаментальную роль в метаболизме данного вида [14, 15]. Более современные работы указывают, что MDH может выполнять и адаптивные функции: участвовать в регенерации NAD^+ при ограниченных ферментативных опциях, обеспечивая выживание клетки ценой снижения эффективности энергетического обмена, а также способствовать устойчивости к метронидазолу за счёт снижения активности железозависимых ферментов [16]. Наши данные о присутствии MDH в протеоме внеклеточных мембранных везикул *B. fragilis* при антибиотическом стрессе согласуются с этими наблюдениями и свидетельствуют о том, что сохранение ключевых ферментов цикла Кребса может быть важным элементом адаптации к стрессовым условиям. Изоцитратдегидрогеназа (IDH) является $NADP^+$-зависимым ферментом цикла трикарбоновых кислот, катализирующий окислительное декарбоксилирование изоцитрата с образованием α-кетоглутарата и восстановленного NADPH. Совместно с малатдегидрогеназой этот фермент обеспечивает поддержание энергетического и редокс-баланса клетки, связывая цикл Кребса с биосинтетическими процессами. У *B. fragilis* активность IDH была экспериментально подтверждена: показано, что гены aconitase (acnA), idh и citrate synthase расположены кластером и котранскрибируются, формируя окислительную ветвь цикла Кребса. При делеции acnA бактерии теряли способность расти на минимальной среде с глюкозой без добавления гема или сукцината, что указывает на наличие у *B. fragilis* двух путей биосинтеза α-кетоглутарата, через IDH или через сукцинат [17]. Присутствие MDH и IDH в протеоме внеклеточных мембранных везикул при антибиотическом стрессе отражает сохранение критически важных звеньев цикла Кребса, необходимых как для энергетического метаболизма, так и для антиоксидантной защиты за счёт генерации NADPH.

Белки нуклеотидного обмена и метилирования

Также были выявлены белки нуклеотидного обмена и метилирования, демонстрирующие критическую роль в метаболической активности и эпигенетической регуляции исследуемых штаммов.

Аденилосукцинатсинтаза (PurA) играет центральную роль в пуриновом метаболизме и энергетическом гомеостазе клетки [18]. В недавних исследованиях она рассма-

DOI: 10.11134/btp.4.2026.2

тривается, как терапевтическая мишень у бактериальных патогенов. Например, инактивация *purA* у *E. coli* приводит к снижению уровня ATP и повышенной чувствительности к стрессу и антибиотикам, а сам PurA был идентифицирован как мишень антибиотика aurodox, ингибирующего систему секреции III типа у грамотрицательных бактерий [19, 20]. Таким образом, PurA является эволюционно консервативным и функционально значимым ферментом, критически важным для выживания бактерий и их патогенетического потенциала.

SAM-зависимая метилтрансфераза **(rlmI)** представляют собой ключевой регуляторный фермент, осуществляющий катализ переноса метильной группы с молекулы S-аденозилметионина (SAM), выступающей в качестве донора, на разнообразные акцепторные молекулы, включая ДНК, РНК, белки, липиды и низкомолекулярные соединения [21]. У *Bacteroides* подобные метилтрансферазы выполняют важные функции в эпигенетической регуляции, создавая мозаичный эпигенетический ландшафт и влияя на эволюцию группы *B. fragilis*, что демонстрирует критическую роль этих ферментов в адаптации и функционировании бактерий данного рода [22].

Белки антиоксидантной защиты и стресс-ответа

В нашем исследовании среди дифференциально экспрессированных белков ВНМ *B. fragilis* были выявлены ферменты антиоксидантной защиты, включая пероксидазу DyP-типа и тиоредоксин-редуктазу.

Пероксидаза DyP (yfeX) представляет собой гемовый фермент с гексамерной структурой и широкой субстратной активностью, что делает его важным компонентом антиоксидативной защиты анаэробных бактерий. Структурные исследования гомолога из *Bacteroides thetaiotaomicron* подтвердили принадлежность этого белка к семейству DyP-пероксидаз и выявили консервативные мотивы, обеспечивающие связывание гема и каталитическую активность [23].

Тиоредоксин-редуктаза (TrxB) является ключевым компонентом тиоредоксиновой системы, которая у *B. fragilis* выполняет функции основного механизма поддержания тиол/дисульфидного баланса. TrxB обеспечивает восстановление белков и защиту клеточных компонентов при воздействии окислительного стресса, что особенно важно для анаэробных бактерий, подвергающихся антибиотическому стрессу [24, 25].

Белки репликации и трансляции

В протеоме ВНМ *B. fragilis* при антибиотическом стрессе были идентифицированы белки, относящиеся к системам репликации и трансляции. Бета-скользящий зажим (DnaN) представляет собой β-субъединицу ДНК-полимеразы III, образующую кольцевой гомодимер, который охватывает ДНК и обеспечивает высокую процессивность репликации и репарации. Этот белок критически важен для точного копирования генома и устойчивости бактерии к повреждениям ДНК [26]. Рибосомный белок S1 является крупнейшим компонентом малой 30S субъединицы рибосомы и играет ключевую роль в распознавании 5′-области мРНК, стабилизации транскрипта и инициации трансляции. Его присутствие в OMV отражает возможное участие рибосомных компонентов в регуляции белкового синтеза и адаптации к стрессовым условиям [27].

Неохарактеризованные и гипотетические белки

Среди идентифицированных белков был обнаружен гипотетический белок с предполагаемой экспортной локализацией (UniProt ID:**Q5LGL0)**. Подобные белки широко представлены в геномах *Bacteroides* и других грамотрицательных бактерий, однако их функции остаются неохарактеризованными [28]. Наличие сигнального пептида указывает на то, что данный белок может секретироваться или участвовать во взаимодействии с клеточной оболочкой. Помимо него, были обнаружены ещё три неохарактеризованных белка с неизвестной функцией, что подчёркивает наличие в составе OMV компонентов, биологическое значение которых требует дальнейшего изучения.

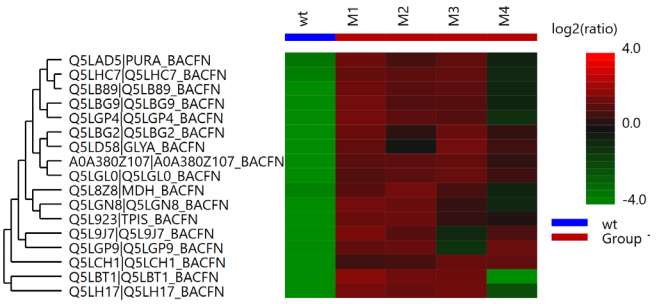


Рисунок 2. Тепловая карта дифференциально экспрессированных белков во внеклеточных мембранных везикулах *Bacteroides fragilis* при воздействии меропенема (M1–M4) по сравнению с **wMEM4** (культура после отмены антибиотика на 8 сутки). На дендрограмме слева показана кластеризация белков по схожести профиля экспрессии. Цветовая шкала отображает $\log_2$(отношение интенсивностей): красный соответствует повышенной экспрессии, зелёный — сниженной, чёрный — отсутствию изменений.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы охарактеризовали протеом ВНМ *B. fragilis* при антибиотическом стрессе. Выявлены белки, связанные с метаболизмом, антиоксидантной защитой, репликацией и трансляцией, а также ряд неохарактеризованных белков. Эти результаты подчёркивают функциональное разнообразие ВНМ и их участие в адаптации бактерии. ВНМ могут выступать как транспортные структуры для ферментов и факторов выживания, распределяемых в бактериальном сообществе и способствующих адаптации при воздействии антибиотического стресса [3].

Секреция ВНМ у *B. fragilis* рассматривается как один из ключевых механизмов адаптации к неблагоприятным условиям. Показано, что ВНМ могут включать ферменты энергетического и антиоксидантного метаболизма, обеспечивая защиту клетки от оксидативного стресса и действия антибиотиков. У токсигенных штаммов такие везикулы функционируют как метаболически активные структуры, способные поддерживать процессы гликолиза и ТСА-цикла вне клетки. Таким образом, обнаружение в протеоме ВНМ *B. fragilis* белков стресс-ответа и энергетического обмена согласуется с данными о роли этих структур в поддержании устойчивости бактерии к антибиотическому стрессу [5].

В ВНМ *B. fragilis* при антибиотическом стрессе были

DOI: 10.11134/btp.4.2026.2

обнаружены ферменты основных метаболических путей, включая катаболизм аминокислот, гликолиз и цикл трикарбоновых кислот. Так, **2-амино-3-кетобутират-КоА-лигаза** обеспечивает образование ацетил-КоА и глицина из треонина, связывая аминокислотный обмен с энергетикой. Аденилсукцинат-синтетаза участвует в биосинтезе AMP и поддержании энергетического пула нуклеотидов. Ферменты TCA (малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа) и гликолиза (триозофосфат-изомераза, PFP) поддерживают энергетический баланс и редокс-гомеостаз, а гликогенфосфорилаза обеспечивает мобилизацию запасов углеводов. Интересно отметить, что выявленный нами белок серин-гидроксиметилтрансфераза (SHMT) не только играет ключевую роль в одноуглеродном обмене, связывая аминокислотный и нуклеотидный метаболизм, но и обладает эволюционной значимостью. Ранее было показано, что у представителей филума *Bacteroides*, а также родственных групп (*Chlorobi*, *Fibrobacteres*), SHMT содержит крупные консервативные вставки (indels), отсутствующие у других бактерий. Это подтверждает филогенетическую уникальность данного фермента и указывает на его устойчивую эволюционную фиксацию. Таким образом, обнаружение SHMT в протеоме BHM *B. fragilis* при антибиотическом стрессе подчёркивает как его функциональное, так и филогенетическое значение [29]. Малатдегидрогеназа (MDH) играет ключевую роль не только в цикле трикарбоновых кислот, но и в поддержании редокс-баланса за счёт восстановления оксалоацетата в малат. В условиях, когда альтернативные пути регенерации NAD^+ ограничены, активность MDH обеспечивает сохранение метаболической гибкости, хотя и ценой снижения выхода энергии. Подобные перестройки метаболизма рассматриваются как возможный механизм устойчивости к метронидазолу, что может иметь значение и для адаптации *B. fragilis* при антибиотическом стрессе [16].

Функциональные особенности пирофосфат-зависимой фосфофруктокиназы (PPi-PFK) позволяют рассматривать этот фермент как потенциальный элемент стресс-адаптации у бактерий. В отличие от канонической АТФ-зависимой PFK, реакция с участием PPi-PFK является обратимой и энергетически более экономной, поскольку использует пирофосфат (PPi) вместо АТФ. Такая особенность обеспечивает гибкость углеводного обмена, позволяя клетке переключаться между гликолизом и глюконеогенезом в зависимости от условий [30]. Для анаэробных бактерий, включая *Bacteroides fragilis*, это может быть особенно важно в условиях ограниченной доступности энергии или при воздействии антибиотиков, когда требуется перераспределение метаболических потоков для поддержания выживания. В нашем исследовании присутствие PPi-PFK в протеоме OMV при действии меропенема может отражать активацию «экономичных» метаболических стратегий, направленных на сохранение энергетического баланса в стрессовых условиях.

Тиоредоксин-редуктаза имеет критическое значение для выживания и вирулентности *B. fragilis*. Ранее показано, что инактивация *trxB* приводит к утрате способности формировать абсцессы в модели внутрибрюшной инфекции у мышей, а также к резкой чувствительности клеток к кислороду и перекиси водорода. Таким образом, выявление TrxB в составе BHM указывает на возможную роль этого фермента в адаптации к антибиотическому стрессу, сопровождающемуся образованием реактивных форм кислорода, и подтверждает его значение как фактора патогенеза [24]. Недавние исследования показали, что TrxR *B. fragilis* усиливает активность при экспозиции к кислороду и перекиси водорода, что подчеркивает его роль в устойчивости анаэроба к окислительному стрессу [25]. Более того, TrxR способен катализировать нитроредуктазные реакции, однако, в отличие от TrxR протистов, не участвует в активации метронидазола, что может объяснять специфические особенности устойчивости *B. fragilis* к этому антибиотику.

DnaN рассматривается как перспективная антибиотическая мишень: его консервативная структура, уникальность по сравнению с эукариотическими аналогами и высокая важность для выживания бактерий делают β-скользящий зажим привлекательным объектом для разработки новых антибактериальных препаратов [26]. Его присутствие в протеоме OMV при антибиотическом стрессе может указывать на участие систем репликации и репарации ДНК в ответе *B. fragilis* на повреждения, индуцированные антибиотиком.

Идентификация белков репликации и трансляции в протеоме BHM *B. fragilis* согласуется с данными о том, что эти процессы могут быть вовлечены в адаптацию бактерии к стрессовым условиям. β-скользящий зажим (DnaN) рассматривается как перспективная антибиотическая мишень благодаря своей консервативной структуре, критической роли в репликации и отсутствию гомологов у эукариот [26]. Его присутствие в OMV при антибиотическом стрессе может указывать на активацию систем репарации и защиты генома. Рибосомный белок S1, ключевой элемент инициации трансляции, связывается с 5′-областью мРНК и стабилизирует её на рибосоме [27]. Выявление S1 в составе BHM может отражать перераспределение рибосомных компонентов в ответ на антибиотики и потенциальную роль BHM в передаче белков, связанных с контролем трансляции.

Сравнение наших результатов с предыдущими протеомными исследованиями *B. fragilis* демонстрирует как общие черты, так и различия в метаболической адаптации. Так, в работе Veloso и соавт. (2013) [31], где бактерии инкубировали в субингибирующей концентрации пиперациллин/тазобактама, наблюдалось снижение уровня триозофосфатизомеразы (TPI) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), тогда как аминокислото-гистидиновая дипептидаза (PepD) и субъединицы АТФ-синтазы увеличивались. В нашем исследовании, проведённом с использованием безметочного количественного анализа экспрессии белков при воздействии меропенема, мы обнаружили противоположную динамику TPI — значимое повышение уровня фермента. Это может отражать различия в метаболической перестройке *B. fragilis* в ответ на различные β-лактамные антибиотики. При этом совпадающее увеличение PepD указывает на универсальную роль пептидного метаболизма в механизмах адаптации, тогда как разнонаправленные изменения гликолитических ферментов подчеркивают специфичность стресс-ответа в за-

DOI: 10.11134/btp.4.2026.2

висимости от природы антимикробного воздействия.

Присутствие консервативного гипотетического экспортируемого белка и трёх неохарактеризованных белков в протеоме ВНМ *B. fragilis* подчёркивает, что значительная часть внеклеточных факторов этой бактерии остаётся функционально неописанной. Подобные находки типичны для протеомных исследований анаэробов, где многие белки сохраняются эволюционно, но их роль в метаболизме и патогенезе остаётся неизвестной. Эти результаты указывают на необходимость дальнейших исследований по функциональной характеристике таких белков, поскольку именно среди них могут скрываться новые факторы вирулентности или элементы стресс-ответа, важные для антибиотикоустойчивости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеомный анализ внеклеточных мембранных везикул *Bacteroides fragilis* при воздействии меропенема позволил выявить изменения в составе белков, отражающие метаболическую и стрессовую адаптацию бактерии. В протеоме были идентифицированы ферменты катаболизма аминокислот, гликолиза и цикла трикарбоновых кислот, участвующие в поддержании энергетического баланса, а также белки антиоксидантной защиты, репликации и трансляции. Выявление серин-гидроксиметилтрансферазы и пирофосфат-зависимой фосфофруктокиназы указывает на использование альтернативных и энергетически «экономных» метаболических стратегий. Обнаружение тиоредоксин-редуктазы подтверждает важность антиоксидативных механизмов в условиях антибиотического стресса. Присутствие неохарактеризованных белков подчёркивает, что значительная часть ВНМ остаётся функционально неизученной и требует дальнейшей характеристики. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ВНМ *B. fragilis* играют ключевую роль в адаптации к антибиотическому стрессу и могут рассматриваться как перспективный объект для изучения механизмов устойчивости и потенциальная мишень для разработки новых терапевтических стратегий.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция исследования: К.С., Т.П.; методология: К.А., А.Д., Б.А..; статистический анализ: А.С.; дизайн исследования: К.С., Т.П.; интерпретация данных: К.А., А.S.; подготовка первоначального варианта рукописи: А.С.; рецензирование и редактирование: А.С., Т.П.; научное руководство: К.С. Все авторы прочитали и одобрили окончательную версию рукописи для публикации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта ГФ AP32727787 (источник финансирования – Комитет науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан).

ЛИТЕРАТУРА

1. King C.H., Desai H., Sylvetsky A.C., et al. Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template // PLOS ONE. – 2019. – Vol. 14, No. 9. – P. e0206484. – DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206484

2. Jasemi S., Emaneini M., Ahmadinejad Z., et al. Antibiotic resistance pattern of *Bacteroides fragilis* isolated from clinical and colorectal specimens // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2021. – Vol. 20, No. 1. – P. 27. – DOI: https://doi.org/10.1186/s12941-021-00435-w

3. Schwechheimer C., Kuehn M.J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions // Nature Reviews Microbiology. – 2015. – Vol. 13, No. 10. – P. 605–619. – DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro3525

4. Sears C.L., Geis A.L., Housseau F. *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis // Journal of Clinical Investigation. – 2014. – Vol. 124, No. 10. – P. 4166–4172. – DOI: https://doi.org/10.1172/JCI72334

5. Zakharzhevskaya N.B., Vanyushkina A.A., Altukhov I.A., et al. Outer membrane vesicles secreted by pathogenic and nonpathogenic Bacteroides fragilis represent different metabolic activities // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, No. 1. – P. 5008. – DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-017-05264-6

6. Gilmore W.J., Johnston E.L., Bitto N.J., et al. *Bacteroides fragilis* outer membrane vesicles preferentially activate innate immune receptors compared to their parent bacteria // Frontiers in Immunology. – 2022. – Vol. 13. – P. 970725. – DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.970725

7. Kozhakhmetova S., Zholdybayeva E., Tarlykov P., et al. Determinants of resistance in *Bacteroides fragilis* strain BFR_KZ01 isolated from a patient with peritonitis in Kazakhstan // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2021. – Vol. 25. – P. 1–4. – DOI: https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.022

8. Schmidt A., Sivaraman J., Li Y., et al. Three-dimensional structure of 2-amino-3-ketobutyrate CoA ligase from *Escherichia coli* complexed with a PLP–substrate intermediate: inferred reaction mechanism // Biochemistry. – 2001. – Vol. 40, No. 17. – P. 5151–5160. – DOI: https://doi.org/10.1021/bi002204y

9. Dev I.K., Harvey R.J. Sources of one-carbon units in the folate pathway of *Escherichia coli* // Journal of Biological Chemistry. – 1982. – Vol. 257, No. 4. – P. 1980–1986. – DOI: https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)68135-4

10. Nemoto T.K., Ohara-Nemoto Y. Dipeptidyl-peptidases: key enzymes producing entry forms of extracellular proteins in asaccharolytic periodontopathic bacterium Porphyromonas gingivalis // Molecular Oral Microbiology. – 2021. – Vol. 36, No. 2. – P. 145–156. – DOI: https://doi.org/10.1111/omi.12317

11. Seok Y., Koo BM, Sondej M, Peterkofsky A. Regulation of *Escherichia coli* glycogen phosphorylase activity by HPr // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. – 2001. – Vol. 3, No. 3. – P. 385–393. PMID: 11361069

12. Noble M.E.M., Zeelen J.P., Wierenga R.K., et al. Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution // Acta Crystallographica

Section D. – 1993. – Vol. 49, No. 4. – P. 403–417. – DOI: https://doi.org/10.1107/S0907444993002628

13. Compton J.A., Patrick W.M. The more we learn, the more diverse it gets: structures, functions and evolution in the phosphofructokinase superfamily // Biochemical Journal. – 2025. – Vol. 482, No. 9. – P. 467–483. – DOI: https://doi.org/10.1042/BCJ20253024

14. Shah H.N., Williams R.A.D. Dehydrogenase patterns in the taxonomy of Bacteroides // Microbiology. – 1982. – Vol. 128, No. 12. – P. 2955–2965. – DOI: https://doi.org/10.1099/00221287-128-12-2955

15. Shah H.N., Al-Jalili T.A.R., Elhag K.M., Mundegar Z.R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malate dehydrogenase enzyme electrophoretic patterns amongst strains of *Bacteroides fragilis* // Microbiology. – 1987. – Vol. 133, No. 7. – P. 1975–1981. – DOI: https://doi.org/10.1099/00221287-133-7-1975

16. Paunkov A., Hummel K., Strasser D., Sóki J., Leitsch D. Proteomic analysis of metronidazole resistance in the human facultative pathogen *Bacteroides fragilis* // Frontiers in Microbiology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1158086.– DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1158086

17. Baughn A.D., Malamy M.H. A mitochondrial-like aconitase in the bacterium *Bacteroides fragilis*: implications for the evolution of the mitochondrial Krebs cycle // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2002. – Vol. 99, No. 7. – P. 4662–4667. – DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.052710199

18. Honzatko R.B., Fromm H.J. Structure–function studies of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli* // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1999. – Vol. 370, No. 1. – P. 1–8. – DOI: https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1383

19. Kano T., Ishikawa K., Furuta K., Kaito C. Knockout of adenylosuccinate synthase purA increases susceptibility to colistin in *Escherichia coli* // FEMS Microbiology Letters. – 2024. – Vol. 371. – P. fnae007. – DOI: https://doi.org/10.1093/femsle/fnae007

20. Watanabe Y., Haneda T., Kimishima A., et al. PurA is the main target of aurodox, a type III secretion system inhibitor // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2024. – Vol. 121, No. 17. – P. e2322363121. – DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.2322363121

21. Martin J. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold // Current Opinion in Structural Biology. – 2002. – Vol. 12, No. 6. – P. 783–793. – DOI: https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00391-3

22. Tisza M.J., Smith D.D.N., Clark A.E., et al. Roving methyltransferases generate a mosaic epigenetic landscape and influence evolution in *Bacteroides fragilis* group // Nature Communications. – 2023. – Vol. 14, No. 1. – P. 4082. – DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-023-39892-6

23. Zubieta C., Krishna S.S., Kapoor M., et al. Crystal structures of two novel dye-decolorizing peroxidases reveal a β-barrel fold with a conserved heme-binding motif // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2007. – Vol. 69, No. 2. – P. 223–233. – DOI: https://doi.org/10.1002/prot.21550

24. Rocha E.R., Tzianabos A.O., Smith C.J. Thioredoxin reductase is essential for thiol/disulfide redox control and oxidative stress survival of the anaerobe *Bacteroides fragilis* // Journal of Bacteriology. – 2007. – Vol. 189, No. 22. – P. 8015–8023. – DOI: https://doi.org/10.1128/JB.00714-07

25. Paunkov A., Kupc M., Sóki J., Leitsch D. Characterization of the components of the thioredoxin system in *Bacteroides fragilis* and evaluation of its activity during oxidative stress // Anaerobe. – 2022. – Vol. 73. – P. 102507. – DOI: https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102507

26. Elgaher W.A.M., Hapko U., Rasheed S., Müller R., Hirsch A.K.H. Targeting the bacterial β-sliding clamp (DnaN): a promising strategy for novel antibiotics // Annual Reports in Medicinal Chemistry. – 2023. – Vol. 61. – P. 163–195. – DOI: https://doi.org/10.1016/bs.armc.2023.10.005

27. Sengupta J., Agrawal R.K., Frank J. Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2001. – Vol. 98, No. 21. – P. 11991–11996. – DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.211266898

28. Cerdeño-Tárraga A.M., Patrick S., Crossman L.C., et al. Extensive DNA inversions in the *Bacteroides fragilis* genome control variable gene expression // Science. – 2005. – Vol. 307, No. 5714. – P. 1463–1465. – DOI: https://doi.org/10.1126/science.1107008

29. Gupta R.S., Lorenzini E. Phylogeny and molecular signatures (conserved proteins and indels) that are specific for the Bacteroidetes and Chlorobi species // BMC Evolutionary Biology. – 2007. – Vol. 7, No. 1. – P. 71. – DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-71

30. Reshetnikov A.S., Rozova O.N., Khmelenina V.N., et al. Characterization of the pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase from Methylococcus capsulatus Bath // FEMS Microbiology Letters. – 2008. – Vol. 288, No. 2. – P. 202–210. – DOI: https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01366.x

31. Veloso L.D.C., Dos Santos K.V., De Andrade H.M., et al. Proteomic changes in *Bacteroides fragilis* exposed to subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam // Anaerobe. – 2013. – Vol. 22. – P. 69–76. – DOI: https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.04.007

REFERENCES

1. King C.H., Desai H., Sylvetsky A.C., et al. Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template // PLOS ONE. – 2019. – Vol. 14, No. 9. – P. e0206484. – DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206484

2. Jasemi S., Emaneini M., Ahmadinejad Z., et al. Antibiotic resistance pattern of *Bacteroides fragilis* isolated from clinical and colorectal specimens // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2021. – Vol. 20, No. 1. – P. 27. – DOI: https://doi.org/10.1186/s12941-021-00435-w

3. Schwechheimer C., Kuehn M.J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions // Nature Reviews Microbiology. – 2015. – Vol. 13, No. 10. – P. 605–619. – DOI: https://doi.org/10.1038/

DOI: 10.11134/btp.4.2026.2

nrmicro3525

4. Sears C.L., Geis A.L., Housseau F. *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis // Journal of Clinical Investigation. – 2014. – Vol. 124, No. 10. – P. 4166–4172. – DOI: https://doi.org/10.1172/JCI72334

5. Zakharzhevskaya N.B., Vanyushkina A.A., Altukhov I.A., et al. Outer membrane vesicles secreted by pathogenic and nonpathogenic Bacteroides fragilis represent different metabolic activities // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, No. 1. – P. 5008. – DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-017-05264-6

6. Gilmore W.J., Johnston E.L., Bitto N.J., et al. *Bacteroides fragilis* outer membrane vesicles preferentially activate innate immune receptors compared to their parent bacteria // Frontiers in Immunology. – 2022. – Vol. 13. – P. 970725. – DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.970725

7. Kozhakhmetova S., Zholdybayeva E., Tarlykov P., et al. Determinants of resistance in *Bacteroides fragilis* strain BFR_KZ01 isolated from a patient with peritonitis in Kazakhstan // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2021. – Vol. 25. – P. 1–4. – DOI: https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.022

8. Schmidt A., Sivaraman J., Li Y., et al. Three-dimensional structure of 2-amino-3-ketobutyrate CoA ligase from *Escherichia coli* complexed with a PLP–substrate intermediate: inferred reaction mechanism // Biochemistry. – 2001. – Vol. 40, No. 17. – P. 5151–5160. – DOI: https://doi.org/10.1021/bi002204y

9. Dev I.K., Harvey R.J. Sources of one-carbon units in the folate pathway of *Escherichia coli* // Journal of Biological Chemistry. – 1982. – Vol. 257, No. 4. – P. 1980–1986. – DOI: https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)68135-4

10. Nemoto T.K., Ohara-Nemoto Y. Dipeptidyl-peptidases: key enzymes producing entry forms of extracellular proteins in asaccharolytic periodontopathic bacterium Porphyromonas gingivalis // Molecular Oral Microbiology. – 2021. – Vol. 36, No. 2. – P. 145–156. – DOI: https://doi.org/10.1111/omi.12317

11. Seok Y., Koo BM, Sondej M, Peterkofsky A. Regulation of *Escherichia coli* glycogen phosphorylase activity by HPr // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. – 2001. – Vol. 3, No. 3. – P. 385–393. PMID: 11361069

12. Noble M.E.M., Zeelen J.P., Wierenga R.K., et al. Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution // Acta Crystallographica Section D. – 1993. – Vol. 49, No. 4. – P. 403–417. – DOI: https://doi.org/10.1107/S0907444993002628

13. Compton J.A., Patrick W.M. The more we learn, the more diverse it gets: structures, functions and evolution in the phosphofructokinase superfamily // Biochemical Journal. – 2025. – Vol. 482, No. 9. – P. 467–483. – DOI: https://doi.org/10.1042/BCJ20253024

14. Shah H.N., Williams R.A.D. Dehydrogenase patterns in the taxonomy of Bacteroides // Microbiology. – 1982. – Vol. 128, No. 12. – P. 2955–2965. – DOI: https://doi.org/10.1099/00221287-128-12-2955

15. Shah H.N., Al-Jalili T.A.R., Elhag K.M., Mundegar Z.R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malate dehydrogenase enzyme electrophoretic patterns amongst strains of *Bacteroides fragilis* // Microbiology. – 1987. – Vol. 133, No. 7. – P. 1975–1981. – DOI: https://doi.org/10.1099/00221287-133-7-1975

16. Paunkov A., Hummel K., Strasser D., Sóki J., Leitsch D. Proteomic analysis of metronidazole resistance in the human facultative pathogen *Bacteroides fragilis* // Frontiers in Microbiology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1158086. – DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1158086

17. Baughn A.D., Malamy M.H. A mitochondrial-like aconitase in the bacterium *Bacteroides fragilis*: implications for the evolution of the mitochondrial Krebs cycle // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2002. – Vol. 99, No. 7. – P. 4662–4667. – DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.052710199

18. Honzatko R.B., Fromm H.J. Structure–function studies of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli* // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1999. – Vol. 370, No. 1. – P. 1–8. – DOI: https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1383

19. Kano T., Ishikawa K., Furuta K., Kaito C. Knockout of adenylosuccinate synthase purA increases susceptibility to colistin in *Escherichia coli* // FEMS Microbiology Letters. – 2024. – Vol. 371. – P. fnae007. – DOI: https://doi.org/10.1093/femsle/fnae007

20. Watanabe Y., Haneda T., Kimishima A., et al. PurA is the main target of aurodox, a type III secretion system inhibitor // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2024. – Vol. 121, No. 17. – P. e2322363121. – DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.2322363121

21. Martin J. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold // Current Opinion in Structural Biology. – 2002. – Vol. 12, No. 6. – P. 783–793. – DOI: https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00391-3

22. Tisza M.J., Smith D.D.N., Clark A.E., et al. Roving methyltransferases generate a mosaic epigenetic landscape and influence evolution in *Bacteroides fragilis* group // Nature Communications. – 2023. – Vol. 14, No. 1. – P. 4082. – DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-023-39892-6

23. Zubieta C., Krishna S.S., Kapoor M., et al. Crystal structures of two novel dye-decolorizing peroxidases reveal a β-barrel fold with a conserved heme-binding motif // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2007. – Vol. 69, No. 2. – P. 223–233. – DOI: https://doi.org/10.1002/prot.21550

24. Rocha E.R., Tzianabos A.O., Smith C.J. Thioredoxin reductase is essential for thiol/disulfide redox control and oxidative stress survival of the anaerobe *Bacteroides fragilis* // Journal of Bacteriology. – 2007. – Vol. 189, No. 22. – P. 8015–8023. – DOI: https://doi.org/10.1128/JB.00714-07

25. Paunkov A., Kupc M., Sóki J., Leitsch D. Characterization of the components of the thioredoxin system in *Bacteroides fragilis* and evaluation of its activity during oxidative stress // Anaerobe. – 2022. – Vol. 73. – P. 102507. – DOI: https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102507

DOI: 10.11134/btp.4.2026.2

26. Elgaher W.A.M., Hapko U., Rasheed S., Müller R., Hirsch A.K.H. Targeting the bacterial β-sliding clamp (DnaN): a promising strategy for novel antibiotics // Annual Reports in Medicinal Chemistry. – 2023. – Vol. 61. – P. 163–195. – DOI: https://doi.org/10.1016/bs.armc.2023.10.005

27. Sengupta J., Agrawal R.K., Frank J. Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2001. – Vol. 98, No. 21. – P. 11991–11996. – DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.211266898

28. Cerdeño-Tárraga A.M., Patrick S., Crossman L.C., et al. Extensive DNA inversions in the *Bacteroides fragilis* genome control variable gene expression // Science. – 2005. – Vol. 307, No. 5714. – P. 1463–1465. – DOI: https://doi.org/10.1126/science.1107008

29. Gupta R.S., Lorenzini E. Phylogeny and molecular signatures (conserved proteins and indels) that are specific for the Bacteroidetes and Chlorobi species // BMC Evolutionary Biology. – 2007. – Vol. 7, No. 1. – P. 71. – DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-71

30. Reshetnikov A.S., Rozova O.N., Khmelenina V.N., et al. Characterization of the pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase from Methylococcus capsulatus Bath // FEMS Microbiology Letters. – 2008. – Vol. 288, No. 2. – P. 202–210. – DOI: https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01366.x

31. Veloso L.D.C., Dos Santos K.V., De Andrade H.M., et al. Proteomic changes in *Bacteroides fragilis* exposed to subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam // Anaerobe. – 2013. – Vol. 22. – P. 69–76. – DOI: https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.04.007

DOI: 10.11134/btp.4.2026.2

PROTEOMIC ANALYSIS OF EXTRACELLULAR MEMBRANE VESICLES OF *BACTEROIDES FRAGILIS* UNDER ANTIBIOTIC STRESS

S.Sh. Atavliyeva[1,2]*, A.A. Konarbayeva[1], D.N. Auganova[1], A. Bekbayeva[1,2], S.S. Kozhakhmetova[1], P.V. Tarlykov[1]

[1]National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhyn Highway, Astana 010000, Kazakhstan
[2]L.N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satpayev Street, Astana 010008, Kazakhstan
**atavliyeva@biocenter.kz*

ABSTRACT

The high antibiotic resistance of *Bacteroides fragilis* and its ability to combine symbiosis with pathogenicity in the human body make this species a key model for studying the bacterial stress response. Outer membrane vesicles (OMVs), secreted by Gram-negative bacteria, play a key role in intercellular communication, pathogenesis, and adaptation to antibiotics. In this study, we performed a proteomic analysis of *B. fragilis* OMVs exposed to meropenem using LC-MS/MS and label-free quantification (LFQ). Nineteen differentially expressed proteins were identified, belonging to the main functional groups: enzymes of amino acid and carbohydrate metabolism, antioxidant defense proteins, replication and translation factors, and methyltransferases. Taken together, these changes reflect a redistribution of metabolic fluxes toward maintaining energy balance and antioxidant defense under antibiotic stress. Thus, the proteomic profile of *B. fragilis* OMVs demonstrates their significant role in the mechanisms of bacterial survival and resistance, and also highlights their potential involvement in pathogenesis.

Keywords: *Bacteroides fragilis*, extracellular membrane vesicles, antibiotic resistance, proteomics, meropenem, bacterial stress response.

АНТИБИОТИКАЛЫҚ СТРЕСС ЖАҒДАЙЫНДАҒЫ *BACTEROIDES FRAGILIS* ЖАСУШАДАН ТЫС МЕМБРАНАЛЫҚ ВЕЗИКУЛАЛАРЫНЫҢ ПРОТЕОМДЫҚ ТАЛДАУЫ

Атавлиева С.Ш.[1,2]*, Конарбаева А.А.[1], Ауганова Д.Н.[1], Бекбаева А.[1,2], Қожахметова С.С.[1], Тарлыков П.В.[1]

[1]Ұлттық биотехнология орталығы, 010000, Қазақстан, Астана қ., Қорғалжын тасжолы, 13/5
[2]Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, 010008, Қазақстан, Астана қ., Сәтбаев көшесі, 2
**atavliyeva@biocenter.kz*

АБСТРАКТ

Bacteroides fragilis бактериясының антибиотиктерге жоғары төзімділігі және адам ағзасында симбиоз бен патогенділікті ұштастыра алу қабілеті бұл түрді бактериялардың стресс-жауабын зерттеудің негізгі моделіне айналдырады. Грамтеріс бактериялар бөлетін сыртқы мембрана везикулалары (СМВ) жасушааралық коммуникацияда, патогенезде және антибиотиктерге бейімделуде маңызды рөл атқарады. Бұл жұмыста LC-MS/MS және таңбасыз сандық талдауды (LFQ) қолдана отырып, меропенем әсер еткен кездегі *B. fragilis* СМВ-ның протеомдық талдауы жүргізілді. Негізгі функционалдық топтарға жататын 19 дифференциалды экспрессияланған белок анықталды: аминқышқылдары мен көмірсулар метаболизмінің ферменттері, антиоксиданттық қорғаныс белоктары, репликация және трансляция факторлары, сондай-ақ метилтрансферазалар. Бұл өзгерістердің жиынтығы антибиотиктік стресс жағдайында метаболизм ағындарының энергетикалық тепе-теңдікті және антиоксиданттық қорғанысты сақтауға қарай қайта бөлінуін көрсетеді. Осылайша, *B. fragilis* СМВ-ның протеомдық профилі олардың бактерияның аман қалу және төзімділік механизмдеріндегі маңызды рөлін көрсетеді, сонымен қатар патогенезге ықтимал қатысуын айқындайды.

Түйін сөздер: *Bacteroides fragilis*, жасушадан тыс мембраналық везикулалар, антибиотикке төзімділік, протеомика, меропенем, бактериялардың стресс-жауабы.