

УДК 546.47.3.96:616.61.612.07

Е.В. Егоршина¹, Л.Я. Этманова¹,
Л.Г.Тертычная¹, Е.Ю. Лемеш¹,
Е.А. Уточкина¹, Т.В. Кокина¹,
Г.А. Куприянова¹, П.Е. Бородин³,
Е.А. Бородин¹, Н.Ю. Леусова²,
В.Г. Моисеенко²

ФГБОУ ВО Амурская ГМА
Минздрава России¹
г. Благовещенск

ФГБУН Институт геологии
и природопользования ДВО РАН²
г. Благовещенск

ГАУЗ АО «Амурская
областная клиническая больница»³
г. Благовещенск

МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ И БЕЛКИ S-СЛОЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. БИОИНФОРМАТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Для оценки содержания наноразмерного золота в минеральном сырье предложено использование биосенсоров на основе гибридных микроорганизмов, полученных методами генной инженерии с высоким сродством к ионам золота [1]. Создание таких устройств подразумевает наличие четких представлений о молекулярных механизмах биоминерализации золота микроорганизмами [2]. Белки микроорганизмов играют важную роль в сорбции наночастиц золота микроорганизмами и восстановлении его катионов до атомного состояния с последующей кристаллизацией и образованием морфологических структур. Целью исследования явились выявление и биоинформатическая характеристика белков микроорганизмов, участвующих в биоминерализации золота. В задачи исследования входили анализ состояния проблемы, выявление класса белков, участвующих в биоминерализации металлов, получение информации о первичных структурах представителей этих классов белков в FASTA-формате, проведение

Резюме Микроорганизмы играют важную роль в биоминерализации золота. В этом процессе участвуют два типа белков, а именно белки S-layer и металлотioneины. Эти белки могут быть использованы для создания биосенсоров на основе гибридных микроорганизмов, полученных методами генной инженерии с высоким сродством к ионам золота. Мы использовали биоинформационные методы, чтобы получить информацию о первичных структурах этих белков в формате FASTA, провести множественное выравнивание их аминокислотных последовательностей и идентифицировать характерные мотивы в их первичных структурах.

Ключевые слова: биоминерализация золота, металлотioneины, белки S-слоя, биоинформатика.

множественного выравнивания их аминокислотных последовательностей, выявление характерных мотивов в их первичных структурах.

Материалы и методы исследования

Мы использовали базу данных PubMed для поиска публикаций о белках, участвующих в минерализации золота, и базу данных UniProt для получения первичных структур металлотioneинов (MT) в FASTA-формате. Многократное выравнивание первичных структур MT было выполнено автоматически на сервере UniProt с опцией Alignment [3]. Выравнивание было сделано отдельно для таксономических групп.

Результаты исследования

1. Идентификация белков микроорганизмов, участвующих в процессах биоминерализации золота. Методами биоинформатики можно работать только с индивидуальными белками, чья первичная структура, т. е. последовательность аминокислот (АМК) в полипептидной цепи, известна и хранится в электронных банках данных. В сорбции металлов грамм-положительными бактериями участвуют протеогликаны клеточной стенки. Идентификация первичных структур возможна только для одной группы этих белков – белков поверхностного слоя (S-layer proteins) – гликопротеинов, покрывающих клеточную стенку бактерий, составляющих до 15% от массы всех белков бактериальной клетки и имеющих высо-

METALLOTHIONEINS AND PROTEINS OF THE S-LAYER OF MICROORGANISMS. BIOINFORMATIC DESCRIPTION

E.V. Egorshina¹, L.Ya. Etmanova¹, L.G. Ter-tychnaya¹, E.Yu. Lemesh¹, E.A. Utchikina¹, T.V. Kokina¹, G.A. Kupriyanova¹, P.E. Borodin³, E.A. Borodin¹, N.Yu. Leusova², V.G. Moiseenko²

FSBEI HE the Amur State Medical Academy of the Ministry of Health of Russia¹, Blagoveshchensk; FGBUN Institute of Geology and Nature Management FEB RAS², Blagoveshchensk; GAUZ JSC Amur Regional Clinical Hospital³, Blagoveshchensk

Abstract Microorganisms play an important role in the biomineralization of gold. Two types of proteins participate in this process, namely, S-layer proteins and metallothioneins. These proteins may be used for the creation of biosensors based on hybrid microorganisms obtained by genetic engineering methods with high affinity for gold ions. We used bioinformatic methods to obtain information about the primary structures of these proteins in FASTA format, to conduct multiple alignment of their amino acid sequences and identify characteristic motives in their primary structures.

Key words: biomineralization of gold, metallothioneins, S-layer proteins, bioinformatics.

DOI 10.22448/AMJ.2019.3.46-49

CLUSTAL O(1.2.0) multiple sequence alignment (Металлотионеины млекопитающих)

```
SP|sp|P02802|MT1_MOUSE|MDP-NCSCSTGGSCCTCTSSCACKNCKCTSCKKSCCSCPVGCSKCAQGCVC
GAA-----DKCTCCA 61
SP|sp|P02798|MT2_MOUSE|MDP-NCSCASDGSCSCAGACKCKQCKCTSCKKSCCSCPVGCAKCSQGCICK
EAS-----DKSCCA 61
SP|sp|P28184|MT3_MOUSE|MDPETCPCPTGGSTCTCDKCKCKGCKCTNCKKSCCSCPAGCEKCAKDCVC
KGEEGAKAEAEKSCCQ 68
SP|sp|P47945|MT4_MOUSE|MDPGECTCMSGGICICGDNCKCTTCSCKTCRKSCCPCPPGCAKARGCIC
KGG-----DKSCCP 62
*** * * . * * * * * * . * . * . * . * * * * * * * * . * . * * . * . * *
```

CLUSTAL O(1.2.0) multiple sequence alignment (Металлотионеины бактерий)

```
SP|sp|P30331|MT_SYNE7|MTSTTLVKACEPCLCNVDPSKAIDRNGLYYCSEACADGHTGGSKGCGHTGC
NCHG- 56
SP|sp|P08002|MT_SYNSP|-TSTTLVKACEPCLCNVDPSKAIDRNGLYYCSEACADGHTGGSKGCGHTGC
NC--- 53
SP|sp|P30565|MT_THEVL|MTTVTQMKCACPHCLCIVSLNDAIMVDGKPYCSEVCANGTCKENSGCGHAG
CGCGSA 57
* . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

CLUSTAL O(1.2.0) multiple sequence alignment (Металлотионеины микроскопических грибов)

```
SP|sp|P15113|MT1_CANGA|-----MANDCKCP----NGCSPNCANGGCQCGDKCECK----
KQSCHGCG-EQCKCGSHGSSCHGSCGCGDKCECK 63
SP|sp|P15114|MT2_CANGA|-----MPEQVNCQYDCHCSNCACENTCNCC--AKPACACTNSA----
SNECSCQTCKCQTCKC----- 52
SP|sp|P41927|MT1_YARLI|MEFTTAMFGTSLIFTTSTQSKHNLVNNCCS-----SSTSESSM----PASC
ACTKCGCKTCKC----- 55
SP|sp|P41902|CRS5_YEAST|-----MTVKICDCEGECCKDSCHCGSTCLPSCSGGEEKCKCDHSTG
SPQCKSCG-EKCKCETTCTCEKSKCNCEK---- 69
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

CLUSTAL O(1.2.0) multiple sequence alignment (Металлотионеины водорослей)

```
gi|3819156|emb|CAA06729.1|-----MAGTGCKIWEDCKCGAAC 18
gi|220968480|gb|EED86827.1|MNANANSESGK----KRSINENDTVPTTTTNNNPNTNTTCKCSKSRICKLYCDC
FHGGN- 54
gi|307101994|gb|EFN50485.1|MKDT-QCASGICHTPSKRCAAAPDSSRCTRNKECTTRVCGTATKRCGKV
AD----GVKC 55
* : *
gi|3819156|emb|CAA06729.1|SCGDSCTCGTVKK-----GTTSRAGAGCPCGPK-----
CKCTGQGSNCVKKDDCCGCGK-- 67
gi|220968480|gb|EED86827.1|LCNSLCNCTDCKNTTEFREEREWKMKVCLKLNPKAFSESDKFNTKRQRMS
RGNGCACPSHCLKKYCSCFGADAGC---TDKCSNDCE 141
gi|307101994|gb|EFN50485.1|ASDQECATGYCNHGY-GKNAAKWV-----
CGKFPFGSPCRADTDC-TSGTW- 99
* * : * *
```

CLUSTAL O(1.2.0) multiple sequence alignment (Металлотионеины растений)

```
SP|sp|Q39511|MT1_CASGL|MT1_CASGL----MSSCGCGSGCSCGSGCNCK--
NPVLGLSEKTTSKTIVADVAPVKSHPEGSEMS---VEGGHGCKCGSSCNDPCNC-- 71
SP|sp|P43390|MT2_ACTDE|MT2_ACTDE MSCCGGKCGCGSSCSCGSGCGGCGMYPDLSYSEMTTTETLIV
GVAPQKTYFEGSEMG---VAAENGCKCGSDCKCDPCTCK- 78
SP|sp|A2Y1D7|MT3B_ORYSI|MT3B_ORYSI MSDKCGHCDCADKSQCV-----
KKGTSYGVVIVDAEKSHFEMAEV--GYEENDGKCKCTTGCSAGCNCCKG 65
SP|sp|Q0IMG5|MT4A_ORYSJ|MT4A_ORYSJ MSSCGGSCNCSSCKCGSGCGN--MYPDLAECTTNTSATMV
LGVAPAKEQFEGVKGAAESGEEAHGCSGSCCNPCNC-- 78
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Рисунок. Множественное выравнивание первичных структур МТ различных таксономических групп. Идентичные аминокислоты обозначены звездочками (*) схожие двоеточием (:). Остатки цистеина выделены маркером (С)

кую молекулярную массу (40000 – 200000 а.е.м.) [4]. В библиографическую базу данных PubMed включены 44574 публикации, в которых встречается словосочетание S Layer Protein. Из этого числа в 155 публикациях, включая одну обзорную статью, указанное словосочетание находится в заголовке статьи. Внутриклеточные превращения катионов металлов осуществляют цитоплазматические белки – металлотионеины (МТ) [5]. Большинство МТ низкомолекулярные белки (М.м. 500-1400 е.а.м.) с очень высоким (до

30%) содержанием цистеина и практически отсутствием ароматических АМК. В настоящее время исследование МТ лежит преимущественно в области медицины и интерес привлекают преимущественно МТ человека и животных, участвующие в связывании и обезвреживании катионов тяжелых металлов – Cd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺. МТ микроорганизмов посвящены отдельные публикации. О возможном участии МТ в связывании ионов золота ничего не известно. Широкое распространение МТ в природе свидетельству-

ет о разнообразии их функций, одной из которых может быть участие в процессах биоминерализации золота. В библиографической базе данных PubMed идентифицируются 10133 публикации при запросе Metallothionein, включая 4582 публикации, в которых слово МТ находится в заголовке статьи. Из числа последних 216 обзорных статей мета-анализ не проводился. В электронных ресурсах белков представлены следующие количества первичных структур МТ: Proteins - 3709, PIR (Protein Information Resource) – 2882, UniProtKB/Swiss-Prot – 1886, включая 348 МТ микроорганизмов и 1638 организмов эукариотов. Базы данных генов Gene и Genom содержат информацию о 1051 гене и 218 геномах, соответственно связанных с МТ.

2. Отбор представителей МТ для проведения множественного выравнивания АМК последовательностей. Для исследования выбраны представители МТ пяти таксономических групп: позвоночные (Vertebrate), бактерии (Bacteria), микроскопические грибы (Yeast), растения (Plants), водоросли (Algae).

3. Множественное выравнивание АМК последовательностей МТ. Наибольшая степень гомологии характерна для сравниваемых представителей металлотионеинов млекопитающих (семейства МТ-1, МТ-2, МТ-3 и МТ-4) и бактерий. В сравниваемых последовательностях МТ млекопитающих 31 позиция идентичных и 11 схожих АМК, у бактерий - 26 позиций идентичных и 13 схожих АМК. Степень идентичности АМК последовательностей в обоих таксономических группах - 45,6%. Значительно менее гомологичны последовательности МТ растений (12 позиций идентичных и 12 схожих АМК, идентичность 14,6%), микроскопических грибов (7 позиций идентичных и 6 схожих АМК, идентичность 7,3%) и водорослей (5 позиций идентичных и 7 схожих АМК, идентичность 3,3%). Высокую степень гомологии сравниваемых последовательностей МТ в группах млекопитающих и бактерий следует отнести к филогенетической близости сравниваемых организмов и близкому количеству АМК остатков в цепи. Несмотря на схожесть этих параметров у МТ микроскопических грибов степень гомологии их последовательностей существенно ниже. Низкую гомологичность сравниваемых представителей металлотионеинов растений нельзя объяснить различиями в длине цепей, но можно существенными филогенетическими различиями – виды Swamp oak, Kiwi и Rice. Представители металлотионеинов водорослей глубоко различались как филогенетически - на уровне царств (Chromalveolata и Protista), так и длиной полипептидных цепей (67-141 АМК остатков). МТ бактерий содержали 10-11 остатков цистеина, и в них, начиная с 9-го остатка АМК с NH₂-конца

цепи, был отчетливый мотив: -СхСххСх (15) СхххСх (10) СххххСхС- - где С - остатки цистеина, а х - остатки других аминокислот.

Выводы

1. Белки S-слоя и МТ участвуют в процессах биоминерализации золота микроорганизмами. Информация о первичной структуре этих белков доступна в электронных ресурсах.

2. По результатам многократного выравнивания МТ микроорганизмов степень идентичности аминокислотных последовательностей снижается в следующем порядке: МТ бактерий > МТ микроскопических грибов > МТ растений > МТ водорослей.

3. Цистеин является основной аминокислотой, ответственной за связывание металлов с помощью МТ. Определены специфические мотивы распределения цистеина в первичной структуре МТ.

Литература

1. So C.R., Kulp J.L., Oren E.E., Zareie H, Tamerler C., Evans J.S., Sarikaya M. Molecular recognition and supramolecular self-assembly of a genetically engineered gold binding peptide on Au{111} // ACS Nano. 2009 Jun 23;3(6):1525-31. doi: 10.1021/nn900171s.
2. Reith F, Lengke MF, Falconer D, Craw D, Southam G. The geomicrobiology of gold // ISME J. 2007 Nov;1(7):567-84.
3. Бородин П.Е., Бородин Е.А. Биоинформатика как метод системного анализа в биологии и медицине. Биоинформатический анализ растительных серпинов как основа для создания лекарственных средств для коррекции нарушений гемостаза и фибринолиза // Вестник Амурского государственного университета. Серия: Естественно-экономические науки. 2017. №77. Рр. 65-71.
4. Gerbino E, Carasi P, Mobili P, Serradell MA, Gómez-Zavaglia A. Role of S-layer proteins in bacteria. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2015, 31(12):1877-87. doi: 10.1007/s11274-015-1952-9.
5. Ziller A, Fraissinet-Tachet L. Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein / Metallomics. 2018 14;10(11):1549-1559. doi: 10.1039/c8mt00165k.

Статья поступила в редакцию 16.10.2019

Координаты для связи

Егоршина Елена Владимировна, к.м.н.,
доцент кафедры химии ФГБОУ ВО
Амурская ГМА Минздрава России.

Этманова Любовь Яковлевна, ассистент

кафедры химии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Тертычная Лариса Григорьевна, к.м.н., ассистент кафедры химии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Лемеш Елена Юрьевна, к.м.н., ассистент кафедры химии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Уточкина Елена Александровна, к.м.н., доцент кафедры химии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Кокина Тамара Владимировна, старший преподаватель кафедры химии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Куприянова Галина Андреевна, ассистент кафедры химии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Бородин Павел Евгеньевич, врач-невролог ГАУЗ АО «Амурская областная клиническая больница», обособленное структурное подразделение Благовещенская центральная районная поликлиника.

Бородин Евгений Александрович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой химии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Леусова Наталья Юрьевна, к.биол.н., ученый секретарь ФГБУН Институт геологии и природопользования ДВО РАН.

Моисеенко Валентин Григорьевич, академик РАН, д.геол.-минерал. н., главный научный сотрудник – советник РАН, профессор ФГБУН Институт геологии и природопользования ДВО РАН.

Почтовый адрес ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России: 675000, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Горького, 95. E-mail: AmurSMA@AmurSMA.su, science.dep@AmurSMA.su

Почтовый адрес ФГБУН Институт геологии и природопользования ДВО РАН: 675000 г. Благовещенск, ул. Зейская, 239.

Почтовый адрес ГАУЗ АО «Амурская областная клиническая больница»: 675027, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Воронкова, 26.

Богатые антиоксидантами продукты из сои используются в качестве агентов для профилактики и лечения ряда заболеваний [1] и поэтому могут рассматриваться как функциональные продукты. Витамин Е (альфа-токоферол) является основным антиоксидантом сои [2]. Другими липофильными антиоксидантами, присутствующими во многих растениях, в частности, в тыкве, являются каротины в значительных количествах [3], но их содержание в соевых бобах недостаточно [2]. Целью исследования было создание богатых каротином функциональных продуктов из соевых бобов и тыкв и изучение их химического состава.

Материалы и методы исследования

В настоящей работе использованы соя скороспелого сорта Кружевница селекции Всероссийского НИИ сои (г. Благовещенск) и десертная продовольственная тыква сорта Надежда селекции ДВ НИИСХ (г. Хабаровск). Для получения соевого «молока» сою замачивали в течение 12 часов при температуре воды 18-20°C. Набухшие бобы смешивали с водой в соотношении 1:8 и измельчали с одновременным нагреванием. Полученную массу фильтровали, отделяя жидкую фракцию (соевое «молоко») от твердой (окара). Для получения соево-тыквенного напитка замоченную сою смешивали с предварительно подготовленной тыквой и водой, смесь тонко измельчали с одновременным нагреванием и фильтровали. В соево-тыквенный напиток вносили аскор-

Резюме В статье представлены результаты исследований химического состава сои и ее продуктов для функционального питания. Установлено, что в комбинированных продуктах из соевых бобов и тыквы содержание фосфатидов, витамина Е и каротинов значительно выше, что позволяет рекомендовать их в качестве функциональных продуктов для профилактики и лечения заболеваний, связанных с активацией процессов свободнорадикального окисления.

Ключевые слова: соя, тыква, белок, масло, фосфолипиды, витамин Е, каротины