

Биоинформатический анализ нового бактериоцина III класса из *L. fermentum* 3872

Мачулин А.В.¹, Дерюшева Е.И.², Абрамов В.М.^{3,4}, Косарев И.В.^{3,4}, Карлышев А.В.⁵

¹ФГБУН ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований» РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пуццино, Московская область

²ФГБУН ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований» РАН, Институт биологического приборостроения, Пуццино, Московская область

³ФГБУ “Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов”, Москва

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»

⁵Кингстонский университет, Лондон, Великобритания.

and.machul@gmail.com

Бактериоцины – большое семейство секретируемых бактериями пептидов или белков, обладающих антимикробной активностью и действующих против других штаммов того же вида или близкородственных видов. Одна из важных характеристик бактериоцинов в том, что каждый бактериальный штамм способен образовывать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ. Бактериоцины, продуцированные лактобактериями (*Lactic acid bacteria*, LAB), устойчивы к высоким температурам и обладают повышенной активностью в широком диапазоне pH. В данной работе нами был проведен биоинформатический анализ последовательности нового бактериоцина III класса (BLF3872) из лактобактерии *Limosilactobacillus fermentum* 3872 (LF3872). В BLF3872 предполагается наличие двух структурных доменов. Выявлено, что область 280–404 BLF3872 соответствует домену пептидазы M23. Проведено сравнение BLF3872 с бактериоцинами III класса. Идентифицированы консервативные мотивы (His280 и Asp284 в мотиве HXXXD, His361 и His363 в мотиве HXH), потенциально способные координировать связывание иона Zn²⁺.

Ключевые слова: бактериоцин III класса, *L. fermentum*, цинк-связывающий сайт, структурная организация.

Bioinformatic analysis of a new class III bacteriocin from *L. fermentum* 3872

Machulin A.V.¹, Deryusheva E.I.², Abramov V.M.^{3,4}, Kosarev I.V.^{3,4}, Karlyshev A.V.⁵

¹Scryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino

²Institute for Biological Instrumentation, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino

³Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhozadzor) Federal State Budgetary Institution «The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality», Moscow

⁴FSBI «National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov» Ministry of Healthcare of the Russian Federation

⁵Department of Science, Engineering and Computing, Kingston University London, Kingston upon Thames KT1 2EE, UK

Bacteriocins are a large family of peptides or proteins secreted by bacteria. Bacteriocins have antimicrobial activity and act against other strains of the same or closely related species. One of the important characteristics of bacteriocins is that each bacterial strain is able to form one or more strictly specific antibiotic substances. Bacteriocins produced by lactobacilli (*Lactic acid bacteria*, LAB) are resistant to high temperatures and have increased activity over a wide pH range. In this work, we carried out a bioinformatic analysis of the sequence of a new class III bacteriocin (BLF3872) from the lactobacillus *Limosilactobacillus fermentum* 3872 (LF3872). The new bacteriocin is assumed to have

two structural domains. The 280-404 region of BLF3872 was found to correspond to the peptidase M23 domain. BLF3872 was compared with bacteriocins. BLF3872 sequence was compared with class III bacteriocins. Conservative motifs (His280 and Asp284 in the HXXXD motif, His361 and His363 in the HXH motif) potentially capable of coordinating the binding of the Zn²⁺ ion were identified.

Key words: class III bacteriocin, L. fermentum, zinc binding site, structural organization.

1. Введение

Бактериоцины – многофункциональные белки, обладающие выраженной антимикробной активностью при определенных концентрациях [1, 2]. Они вырабатываются бактериями и некоторыми представителями архей для подавления роста клеток других штаммов того же вида или родственных видов бактерий. Также, бактериоцины обладают антимикробной активностью в отношении патогенных микроорганизмов, что определяет их биотехнологический потенциал [3, 4]. Бактериоцины ингибируют рост микроорганизмов-мишеней, функционируя прежде всего на клеточной оболочке и влияя на экспрессию генов и продукцию белка внутри клеток [5]. В настоящее время бактериоцины широко используются в различных терапевтических целях (лечение пептической язвы, спермицидные средства), в качестве противораковых агентов, в ветеринарном хозяйстве, при уходе за кожей и полостью рта, а также для стимулирования роста растений в сельском хозяйстве [6–9]. Бактериоцины можно также использовать в качестве естественных консервантов продуктов питания. Один из них, а именно низин, выделяют из бактерии *Streptococcus lactis* [10] уже используют в коммерческих целях (на этикетках продуктов: E234).

По своим структурным и физико-химическим свойствам бактериоцины подразделяются на 3 основных класса: I, II и III [11–13]. Бактериоцины представляют собой пептиды/белки с молекулярной массой от 2 до 35 кДа, существенно отличающихся друг от друга по физико-химическим характеристикам и биологическим эффектам [14, 15]. Выявлено, что на проявление антагонистической активности бактериоцинов, влияют температура, электрическое поле, pH, состав, консистенция среды, присутствие Ca²⁺ и Mg²⁺ и другие факторы [13, 14]. При этом, бактериоцины, продуцированные LAB, по своей природе устойчивы к высоким температурам и известны своей активностью в широком диапазоне pH [16, 17].

Бактериоцины III класса представляют собой антимикробные термочувствительные белки с молекулярной массой более 30 кДа, способные расщеплять муреин клеточной стенки (бактериолизины) [18]. К этой группе относят некоторые колицины, мегацины (*Bacillus megaterium*), клебицины (*Klebsiella pneumoniae*), гельветицины I (*Lactobacillus helveticus*) и энтеролизин (*Enterococcus faecalis*) [7].

В данной работе нами был проведен биоинформатический анализ последовательности нового бактериоцина III класса (BLF3872) из лактобактерии *Limosilactobacillus fermentum* 3872 (LF3872).

2. Материалы и методы

2.1. Идентификация нового бактериоцина

Проведенный нами ранее полногеномный анализ *L. fermentum* 3872 [19] выявил уникальную область, содержащую гены, кодирующие гипотетический белок (835 633–836 847 п.н.). Данная область идентифицируется BAGEL3 [20] как участок (830 634–840 633 п.н.), ответственный за биосинтез бактериоцина класса III.

2.2. Анализ последовательности BLF3872

Физическо-химические параметры BLF3872 (молекулярная масса, pI, особенности аминокислотного состава, индекс нестабильности, алифатический индекс) были вычислены с помощью ProtParam [21].

2.2. Сравнение BLF3872 с бактериоцинами III класса

Последовательности бактериоцинов III класса взяты из базы данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>): энтеролизин A из *Enterococcus faecalis* (UniProt ID Q9F8B0), зооцин A из *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus* (UniProt ID O54308) и зооцина A M23 из *Flavobacterium johnsoniae* (UniProt ID A5FNQ4). Профиль домена пептидазы M23 (PF01551) в последовательностях идентифицировали по базе данных Pfam [22]. Множественное выравнивание последовательностей было реализовано в Clustal Omega [23]. Для оценки сходства последовательностей использовали анализ парных расстояний с помощью MEGAX [24]. Генерация последовательностей логотипов выполнялась сервером WebLogo 3 [25].

3. Результаты и обсуждение

3.1. Характеристика нового бактериоцина

Длина последовательности BLF3872 составляет 404 а.о., а молекулярная масса равна примерно 42.5 кДа; изоэлектрическая точка равна 5.15. В последовательности содержится два остатка цистеина. Белок классифицируется как стабильный (индекс стабильности равен 36.08). Алифатический

индекс равен 62.23, что характеризует белок как средне термостабильную белковую молекулу.

3.2. Сравнение BLF3872 с бактериоцинами III класса

Наиболее изученным бактериоцином III класса является энтеролизин А [26]. Белкам данного класса характерно наличие двух структурных доменов. У энтеролизина А, а также некоторых зооцинов (бактериоцины III класса) идентифицируется профиль пептидазного домена M23 [27] по базе данных Pfam. Белки с этим доменом характеризуются как цинк-металлопептидазы и эндопептидазы со специфичной активностью.

Последовательность BLF3872 была выравнена и сравнена с бактериоцинами III класса. Выявлено, что область 280–404 в BLF3872 соответствует домену пептидазы M23. Проценты идентичности (ClustalO) и попарные расстояния (MEGAX) области 280–404 последовательности BLF3872 с доменом пептидазы M23 из семейства энтеролизина А, зооцина А и пептидазы зооцина А M23 соответственно равны 35 %:1.00, 33 %:1.22 и 33 %:1.12. Попарные расстояния [28] для исследованных последовательностей подтверждают положительную корреляцию между доменами пептидазы M23 в исследованных бактериоцинах III класса и областью в BLF3872.

3.3. Цинк-связывающий сайт в BLF3872

Для энтеролизина А предполагается, что N-концевой домен ответственен за каталитическую активность фермента и способен расщеплять химические связи в пептидогликане бактериальной клеточной стенки [29]. В зооцинах N-концевой домен играет каталитическую роль в гидролизе пептидной связи D-аланил-L-аланин в чувствительном пептидогликане, что приводит к лизису бактериальной клетки [29]. При этом один ион Zn^{2+} координируется двумя консервативными мотивами HXXXD и HXH (где X – любая аминокислота) [30].

Анализ последовательности BLF3872 выявил консервативные остатки в области 280–404 в положениях His280 и Asp284 в мотиве HXXXD, а также His361 и His363 в мотиве HXH. Полученные данные предполагают возможность потенциального модулирования свойств и активности BLF3872 с помощью ионов цинка.

4. Заключение

Таким образом, нами был проведен биоинформатический анализ последовательности нового бактериоцина III класса из *L. fermentum* 3872. Выявлены некоторые функционально значимые особенности его структурной организации. Полученные данные будут использованы для обоснования полученных в дальнейшем экспериментальных данных.

5. Благодарности

Работа поддержана мегагрантом Правительства Российской Федерации (Соглашение от 01.07.2022г. № 075-15-2022-1124)

6. Список литературы

1. Negash A.W., Tsehai B.A. Current Applications of Bacteriocin. *Int. J. Microbiol.* 2020. V. 2020. P. 4374891. doi: [10.1155/2020/4374891](https://doi.org/10.1155/2020/4374891)
2. Chikindas M.L., Weeks R., Drider D., Chistyakov V.A., Dicks L.M. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018. V. 49. P. 23–28. doi: [10.1016/j.copbio.2017.07.011](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011)
3. Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C., Ross P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 2006. V. 16. P. 1058–1071. doi: [10.1016/J.IDAIRYJ.2005.10.026](https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2005.10.026)
4. Güllüce M., Karadayı M., Barış Ö. Bacteriocins: Promising Natural Antimicrobials. In: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education.* 2013. P. 1016–1027.
5. Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 2013. V. 11. P. 95–105. doi: [10.1038/nrmicro2937](https://doi.org/10.1038/nrmicro2937)
6. Juturu V., Wu J.C. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. P. 2187–2200. doi: [10.1016/j.biotechadv.2018.10.007](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007)
7. Kaur S., Kaur S. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Front. Pharmacol.* 2015. V. 6. P. 272. doi: [10.3389/fphar.2015.00272](https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00272)
8. Sutyak K.E., Anderson R.A., Dover S.E., Feathergill K.A., Aroutcheva A.A., Faro S., Chikindas M.L. Spermicidal Activity of the Safe Natural Antimicrobial Peptide Subtilosin. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2008. V. 2008. P. 1–6. doi: [10.1155/2008/540758](https://doi.org/10.1155/2008/540758)
9. Bali V., Panesar P.S., Bera M.B., Kennedy J.F. Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016. V. 56. P. 817–834. doi: [10.1080/10408398.2012.729231](https://doi.org/10.1080/10408398.2012.729231)
10. Barbosa A.A.T., Mantovani H.C., Jain S. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017. V. 37. P. 852–864. doi: [10.1080/07388551.2016.1262323](https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1262323)
11. Foulquié Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 2006. V. 106. P. 1–24. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026)
12. Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D., Kuipers O.P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

2016. V. 100. P. 2939–51. doi: [10.1007/s00253-016-7343-9](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9)
13. De Vuyst L., Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 13. P. 194–199. doi: [10.1159/000104752](https://doi.org/10.1159/000104752)
 14. Minahk C.J., Morero R.D. Inhibition of enterocin CRL35 antibiotic activity by mono- and divalent ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003. V. 37. P. 374–379. doi: [10.1046/j.1472-765X.2003.01411.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01411.x)
 15. Van den Berghe E., De Winter T., De Vuyst L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *Int. J. Food Microbiol.* 2006. V. 107. P. 159–170. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.027](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.027)
 16. Pandey N., Malik R.K., Kaushik J.K., Singroha G. Gassericin A: a circular bacteriocin produced by lactic acid bacteria *Lactobacillus gasserii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 29. P. 1977–1987. doi: [10.1007/s11274-013-1368-3](https://doi.org/10.1007/s11274-013-1368-3)
 17. Camargo A.C., Todorov S.D., Chihib N.E., Drider D., Nero L.A. Lactic Acid Bacteria (LAB) and Their Bacteriocins as Alternative Biotechnological Tools to Control *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Processing Facilities. *Mol. Biotechnol.* 2018. V. 60. P. 712–726. doi: [10.1007/s12033-018-0108-1](https://doi.org/10.1007/s12033-018-0108-1)
 18. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. D227–D233. doi: [10.1093/nar/gkp971](https://doi.org/10.1093/nar/gkp971)
 19. Lehri B., Seddon A.M., Karlyshev A. V Potential probiotic-associated traits revealed from completed high quality genome sequence of *Lactobacillus fermentum* 3872. *Stand. Genomic Sci.* 2017. V. 12. P. 19. doi: [10.1186/s40793-017-0228-4](https://doi.org/10.1186/s40793-017-0228-4)
 20. BAGEL4. URL: <http://bagel.molgenrug.nl/> (accessed 22.09.2022).
 21. ProtParam. URL: <https://web.expasy.org/protparam/> (accessed 31.08.2022).
 22. Pfam. URL: <http://pfam.xfam.org/> (accessed 22.09.2022).
 23. Clustal Omega. URL: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (accessed 31.08.2022).
 24. MEGAX. URL: <https://www.megasoftware.net/> (accessed 22.09.2022).
 25. WebLogo 3. URL: <http://weblogo.threeplusone.com> (accessed 22.09.2022).
 26. Simmonds R.S., Pearson L., Kennedy R.C., Tagg J.R. Mode of action of a lysostaphin-like bacteriolytic agent produced by *Streptococcus zooepidemicus* 4881. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. P. 4536–4551. doi: [10.1128/aem.62.12.4536-4541.1996](https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4536-4541.1996)
 27. Nilsen T., Nes I.F., Holo H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 2975–2984. doi: [10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003)
 28. Jeffares D.C., Tomiczek B., Sojo V., dos Reis M. A beginners guide to estimating the non-synonymous to synonymous rate ratio of all protein-coding genes in a genome. *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1201. P. 65–90. doi: [10.1007/978-1-4939-1438-8_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1438-8_4)
 29. Malinicova L., Dubikova K., Piknova M., Pristas P., Javorsky P. Peptidoglycan Hydrolase Enterolysin A Recognizes Lipoteichoic Acid Chains in the Cell Walls of Sensitive Bacteria. *Protein Pept. Lett.* 2012. V. 19. P. 924–929. doi: [10.2174/092986612802084410](https://doi.org/10.2174/092986612802084410)
 30. Chen Y., Simmonds R.S., Sloan G.L., Timkovich R. The metal binding site of zoocin A. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2008. V. 13. P. 855–60. doi: [10.1007/s00775-008-0371-x](https://doi.org/10.1007/s00775-008-0371-x)