

УДК 639.38 639.211.3

ВЫЯВЛЕНИЕ *IN SILICO* АНТИМИКРОБНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ БЕЛКОВ МОЗГА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ В АСПЕКТЕ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ АКВАКУЛЬТУРЫ

© 2025 г. А. А. Кочнева*, А. Е. Курицын, С. А. Мурзина

Представлено академиком РАН Н. Н. Немовой

Поступило 20.09.2024 г.

После доработки 29.10.2024 г.

Принято к публикации 30.10.2024 г.

Аквакультура является одним из основных поставщиков рыбной продукции и обеспечивает ее устойчивый рост в мире, превышающий промышленное рыболовство. При этом на экологической и производственной повестке стоит проблема комплексной переработки отходов аквакультуры. Отходы переработки рыб остаются после получения целевого продукта (филе, субпродуктов и др.), могут быть “поставщиком” ценных биологических компонентов. В частности, рыбы экспрессируют антимикробные белки, которые проявляют антимикробную активность широкого спектра действия. В настоящей работе впервые проведен поисковый анализ протеома мозга радужной форели *Oncorhynchus mykiss* для выявления теоретических антимикробных паттернов. Более чем для половины идентифицированных белков предсказано наличие антимикробных регионов. К таким белкам относились гистоны, вителлогенин, коллаген и другие. Полученные результаты могут представлять интерес для разработки препаратов на основе пептидов против различных патогенов, что является актуальным направлением на фоне возрастающей антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: радужная форель, *Oncorhynchus mykiss*, антимикробные пептиды, мозг

DOI: 10.31857/S2686738925010099, EDN: tcqnm

ВВЕДЕНИЕ

Аквакультура поставляет рыбную продукцию и обеспечивает ее устойчивый рост в мире, превышающий промышленное рыболовство, в том числе в связи с возрастающим населением планеты [1, 2]. При этом проблема комплексной переработки отходов аквакультуры остро стоит на повестке экологически чистого выращивания гидробионтов и производства товарной продукции, а поисковые исследования, позволяющие определить направления для использования отходов, формируют новый этап освоения биологических ресурсов искусственного выращивания.

Возрастающая антибиотикорезистентность микроорганизмов устанавливает альтернативные горизонты для поиска и изучения антимикробных пептидов (АМП) и их источников [3, 4]. Рыбы могут быть источником АМП, так как экспрессируют все основные классы, такие как дефенсины, кателицидины, гепцидины, гистоновые пептиды, а также специфический для рыб класс семейства цебропинов — писцидины. Антимикробная активность пептидов, выделенных из различных тканей, характеризуется широким спектром действия на различные патогены, кроме того, некоторые из АМП обладают иммуномодулирующим действием, а также могут характеризоваться такими уникальными свойствами, как способность действовать в высоких концентрациях соли. В последнее время АМП рыб рассматриваются для использования в качестве терапевтических агентов, как в медицине, так и ветеринарии [5].

Среди различных видов отходов форелеводства наибольший объем приходится на отходы от разделки (головы, внутренности, хребты и другое), при этом головы могут быть отсортированы

Институт биологии — обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Федерального исследовательского центра
“Карельский научный центр Российской академии наук”,
Петрозаводск, Россия

*e-mail: kochnevaalbina@gmail.com

и переработаны отдельно ввиду содержания как отдельных физиологически значимых компонентов (высокий уровень эйкозапентаеновой и докозагексаеновой жирных кислот в мозгу), так и их сочетаний (соотношение моно- и полиненасыщенных жирных кислот), тем самым выступая нетрадиционным источником для получения данных молекул и веществ. При этом следует отметить, что отходы разделки рыбы (в частности, головы) являются недооцененным и неисследованным сырьем для поиска новых потенциально биологических активных веществ и их композиций. В настоящей работе впервые проведен поисковый анализ протеома мозга радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) для выявления пептидных последовательностей, имеющих потенциальную антимикробную активность, которые, вероятно, могут быть использованы для разработки препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор биологического материала

Исследование проводили на самках радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), выращиваемой на предприятии в Северной Осетии-Алании, со стадией зрелости гонад II–III и V (текущая икра) (табл. 1), забор материала проводился в рамках технологических операций при производстве рыбной продукции. Путем продольного сечения головы проводилось извлечение тканей мозга, после образцы переносили в криобирку и фиксировали в жидком азоте до анализа. Все манипуляции проведены в холодной комнате (+4°C ...–2°C).

Протеомный анализ

Ткани мозга форели были лиофилизированы в лиофильной сушке FreeZone 6 L (Labconco, США). Лизирование клеток проводили в буфере,

содержащем додецилсульфат натрия (SDS) в триэтиламмоний бикарбонате (ТЕАБ), с последующей обработкой ультразвуком. Осаждение и очистку белка осуществляли с использованием метанола и хлороформа. Осадок высушивали и растворяли в 5% SDS в 50 мМ ТЕАБ. Концентрацию белка определяли методом ВСА [6]. Для анализа отбирали объем проб, соответствующий 50 мкг белка. Реакции восстановления и алкилирования проводили путем добавления 0.5 М ТСЕР (трис(2-карбоксииэтил)фосфин) и 400 мМ хлорацетамида в 50 мМ ТЕАБ. Затем добавляли 12% раствор фосфорной кислоты, 6-кратный объем 90% MeOH в 100 мМ ТЕАБ. Пробоподготовку образцов и трипсинолиз проводили на фильтрах Strap (ProtiFi LLC) согласно стандартному протоколу [7, 8]. Полученные смывы объединяли в вставку для ВЭЖХ-МС, упаривали в вакуумном концентраторе и перерастворяли в р-ре муравьиной кислоты. Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили с использованием хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano, соединенной с масс-спектрометром Q-Exactive HF-X в соответствии с описанием, представленным в работе [9].

Идентификацию белков проводили в программе MaxQuant v.1.6.15.0 [10] с использованием алгоритма Andromeda по базе данных UniProtKB для таксона Salmoninae. Были установлены следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ± 5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS ± 0.01 Да, возможность пропуска двух сайтов расщепления трипсином, окисление метионинов, ацетилирование N-конца белка, деамидирование N/Q – возможные модификации пептидов, модификация цистеина хлорацетамидом – обязательная, False Discovery Rate не более 1.0%. Белки определяли как достоверно идентифицированные, если для них было обнаружено минимум два пептида.

Выявление антимикробных регионов в последовательностях идентифицированных белков форели выполнено с использованием сервиса AMPA [11, 12]. AMPA – это веб-приложение для предсказания антимикробных белков на основе анализа их аминокислотной последовательности и определения в ней антимикробных регионов. Антимикробная активность, как правило, свойственна для определенного участка последовательности, характеризующегося подходящим сочетанием гидрофобных и катионных аминокислотных остатков и амфипатической вторичной структурой. Данная особенность такого пептидного участка способствует его взаимодействию с микробными мембранами, вызывая гибель микроорганизмов. Каждая аминокислота имеет определенное значение антимикробной активности (антимикробный

Таблица 1. Описание анализируемых самок форели

№ пробы	Масса особи, кг	Стадия зрелости
01	2.48	V
02	4.12	V
03	2.78	V
04	2.38	V
05	3.58	V
06	2.06	II–III
07	1.92	II–III
08	1.66	II–III
09	1.92	II–III
10	1.8	II–III

индекс, АИ), рассчитанное на основе концентрации IC₅₀, при которой рост микроорганизмов снижается до 50%, с использованием экспериментальных данных скрининга антимикробного пептида бактерии 2А против *Pseudomonas aeruginosa* [12].

Анализ последовательностей проведен со следующими параметрами поиска: threshold value – 0.225, window size – 7.

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП КарНЦ РАН. Масс-спектрометрический анализ проведен в Центре коллективного пользования передовой масс-спектрометрии Сколковского института науки и технологий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В структуре 45 из 85 идентифицированных белков форели выявлены участки, теоретически обладающие антимикробной активностью (табл. 2,

Приложение 1). В таблице 2 представлены значения АИ для каждого предсказанного антимикробного региона и белка в целом. Низкие значения АИ соответствуют высокой антимикробной активности. Так, например, АИ для лизоцима составляет 0.208, а для пептида β-дефензина – 0.183.

Наибольшая антимикробная активность среди идентифицированных в мозгу форели белков предсказана для гистона Н4 и Н2А (0.200 и 0.230 соответственно). В ряде исследований показано, что гистоны рыб обладают антимикробной активностью. Гистон Н2А, выявленный из кожных экссудатов радужной форели *O. mykiss* проявляет антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий [13], а позже был выделен антимикробный пептид, получивший предварительное название “oncorhuncin II”, который представляет собой фрагмент гистона Н1 и обладает ингибирующими свойствами в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий [14]. Гистон, выделенный

Таблица 2. Белки форели, в структуре которых выявлены теоретические антимикробные регионы. Вероятность ошибки классификации, % – это вероятность того, что предсказанный регион случайно окажется в не антимикробном белке

Название и ID белка в базе UniProt	Теоретический антимикробный регион	АИ теоретического антимикробного региона/вероятность ошибки классификации	Среднее значение АИ белка
A0A8K9WVA9 Albumin domain-containing protein	24–40	0.229/12%	0.256
	405–436	0.220/6%	
A0A8C7DXR3 Alpha-actinin-3-like	150–161	0.237/19%	0.259
A0A8C7PBV1 Complement C3	370–381	0.240/23%	0.253
	513–528	0.230/12%	
	609–621	0.238/20%	
A0A8C7PJ62 Cystatin fetuin-B-type domain-containing protein	155–179	0.215/4%	0.256
A0A8C7L8D6 Eukaryotic translation initiation factor 5A	33–52	0.229/12%	0.236
A0A060WRB4 Gelsolin-like domain-containing protein	8–22	0.230/12%	0.256
A0A8C7PDJ5 Vitellogenin domain-containing protein	726–738	0.235/17%	0.262
A0A8K9XIZ2 Complement C4 gamma chain	46–59	0.240/23%	0.255
A0A8C7LQK3 Apolipoprotein E	149–162	0.232/15%	0.254
A0A8C8HPA9 Glycine-tRNA ligase	359–378	0.229/12%	0.255
Q5DW65 Heat shock 90kDa protein 1 beta isoform b	352–364	0.227/10%	0.264
	403–419	0.226/10%	

Продолжение таблицы 2

Название и ID белка в базе UniProt	Теоретический антимикробный регион	АИ теоретического антимикробного региона/вероятность ошибки классификации	Среднее значение АИ белка
A0A8C7UHI1 Heat shock protein family A /Hsp70) member 8b	421–432	0.245/29%	0.256
A0A8C7NT63 High density lipoprotein binding protein a	304–316	0.239/22%	0.253
	377–396	0.232/14%	
	457–469	0.239/22%	
	594–608	0.233/15%	
A0A060Y5W1 Myosin motor domain-containing protein	125–136	0.243/26%	0.261
	138–158	0.232/15%	
	706–727	0.227/10%	
	827–845	0.224/8%	
A0A8C7K854 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	8–20	0.241/24%	0.238
	387–398	0.241/24%	
A0A8C7NHM7 Plectin b	695–718	0.226/9%	0.261
	4018–4034	0.224/8%	
	309–325	0.231/14%	
A0A8K9URE7 Uncharacterized protein	324–340	0.232/14%	0.258
A0A8C7JBH4 Phosphoglycerate kinase	26–39	0.237/20%	0.25
A0A8C8F0U9 Eukaryotic translation initiation factor 4A1B	8–20	0.236/18%	0.244
A0A8C7CTG9 Complement C5	438–452	0.236/19%	0.252
A0A8C7CBU9 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	20–34	0.228/11%	0.250
A0A8C7WD40 Alpha-2-macroglobulin-like	9–24	0.235/17%	0.256
A0A8C7QRB9 Anaphylatoxin-like domain- containing protein	353–367	0.236/18%	0.252
	663–681	0.231/14%	
	1425–1442	0.232/15%	
A0A8K9XTE8 Histone H4	8–40	0.219/5%	0.200
A0A8C7RJ11 Uncharacterized protein	272–288	0.234/16%	0.252
	879–895	0.229/12%	
A0A8K9ULT4 Transforming growth factor, beta-induced	32–50	0.232/15%	0.250
	57–82	0.217/5%	
A0A8K9UN39 Fibrinogen alpha chain	127–138	0.235/17%	0.253
	270–285	0.235/17%	
A0A8C8H534 Moesin a	285–298	0.235/17%	0.258

Окончание таблицы 2

Название и ID белка в базе UniProt	Теоретический антимикробный регион	АИ теоретического антимикробного региона/вероятность ошибки классификации	Среднее значение АИ белка
A0A8C7N9Y6 Alpha-1,4 glucan phosphorylase	72–86	0.238/21%	0.252
	580–610	0.222/7%	
A0A8C7WIV5 Spectrin beta chain	70–82	0.237/20%	0.264
	281–296	0.228/11%	
A0A8C7SXC8 Cystatin kininogen-type domain-containing protein	8–20	0.236/18%	0.261
A0A060Y601 Aconitate hydratase, mitochondrial	695–721	0.219/5%	0.252
A0A060X162 Fibrillar collagen NC1 domain-containing protein	51–65	0.233/15%	0.267
A0A8C7MPL5 Histone H2A	32–60	0.210/3%	0.230
A0A8C7F6H2 Pyruvate kinase	315–327	0.237/19%	0.250
	438–456	0.232/14%	
	461–473	0.239/22%	
A0A8C7HF35 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	749–766	0.231/13%	0.256
A0A8C7STL9 Periplakin	374–385	0.239/22%	0.260
A0A8C7J2N1 Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	1766–1777	0.239/21%	0.268
A0A8C7PTL7 Vesicle amine transport 1	77–95	0.234/16%	0.256
A0A8C7P6S8 Filamin A	28–42	0.23/13%	0.259
	63–79	0.231/13%	
	327–340	0.237/19%	
A0A8C7P2A5 Fibronectin	136–147	0.239/22%	0.257
	335–347	0.237/20%	
	562–578	0.236/18%	
	606–624	0.23/12%	
A0A8C7UWG2 Alpha-2-macroglobulin-like	17–28	0.236/18%	0.253
	706–727	0.224/8%	
A0A8L0DTU3 Fibrillin 1	9–20	0.244/27%	0.256
	138–152	0.236/18%	
	586–605	0.229/12%	
	780–791	0.24/23%	
	964–981	0.232/14%	
	1647–1659	0.234/16%	
	1980–1994	0.236/19%	
	2511–2529	0.234/16%	
Q2L4Q6 Complement factor H	66–84	0.229/12%	0.249
	122–136	0.225/9%	
	248–260	0.235/17%	
	359–381	0.225/9%	

из семенников атлантического лосося *Salmo salar* L., также показал значительную ингибирующую активность в отношении как грамотрицательных и грамположительных бактерий [15].

Антимикробная активность белков, выделенных из тканей рыб, известна и широко обсуждается. Так, показана антибактериальная активность вителлогенина (Vg), выделенного из карпа *Cyprinus carpio* [16]. Этот белок подавлял активность как грамотрицательной бактерии *Escherichia coli*, так и грамположительной — *Staphylococcus aureus*. Известно, что механизм действия этого белка на грамотрицательные бактерии заключается в проявлении сильной связывающей активности с липополисахаридами клеточной стенки. Другой известный белок — коллаген, содержание которого в тканях рыб составляет 10–30%, также обладает высокой антимикробной активностью в отношении *S. aureus*, по-видимому, за счет одного из механизмов, связанного с изменением процессов метаболизма патогена [18]. Рекомбинантный фактор комплемента Н нильской теляпии *Oreochromis niloticus* ((r)OnCFH) в зависимости от его дозы способен связываться с патогенными бактериями и принимать участие в регуляции воспаления и фагоцитозе моноцитов/макрофагов [19].

Таким образом, впервые в рамках настоящего поискового исследования в тканях мозга самок форели были идентифицированы белки, для которых предсказана антимикробная активность. Изучение и поиск новых источников антимикробных пептидов и свойств представляет собой многоэтапный трудоемкий процесс, включающий выделение целевого пептида, его очистку, анализ его активности и т.д. Современные высокопроизводительные алгоритмы *in silico* позволяют предсказать потенциальную антимикробную активность аминокислотных последовательностей, тем самым представляют собой инструмент для эффективного предварительного скрининга и выявления широкого набора пептидов-кандидатов для дальнейшего их многопланового исследования. Полученный результат проведенного теоретического скрининга протеома мозга форели и подтверждение наличия антимикробной активности белков позволяет предположить возможность их выделения и изучения, определения способов и вариантов их применения. Тем самым отходы промышленной переработки рыбной продукции радужной форели, которые не имеют целевой дальнейшей реализации могут стать перспективным нетрадиционным сырьем для поиска и извлечения биологически активных молекул и веществ. Селективное извлечение головного мозга отходов аквакультуры радужной форели можно считать оправданным и перспективным. Однако антимикробные свойства обнаруженных белков необходимо подтвердить экспериментально, требуются дальнейшие исследования в этом направлении.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022–0006.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют эксперименты с животными.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петушкова В.В. Аквакультуры — “Второй хлеб” Китая // Экономические и социальные проблемы России. 2022. Т.2, №50. С.159–174.
2. ФАО. Краткий обзор. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры — 2024. “Голубая трансформация” в действии. Рим: ФАО, 2024.
3. Helmy Y.A., Taha-Abdelaziz K., Hawwas H.A.E.-H., et al. Antimicrobial Resistance and Recent Alternatives to Antibiotics for the Control of Bacterial Pathogens with an Emphasis on Foodborne Pathogens // Antibiotics. 2023; Vol. 12. P. 274.
4. Uddin T.M., Chakraborty A.J., Khusro A., et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects // J Infect Public Health. 2021. Vol. 14, N12. P. 1750–1766.
5. Masso-Silva J.A., Diamond G. Antimicrobial peptides from fish // Pharmaceuticals (Basel). 2014. Vol. 7, N3. P. 265–310.
6. Walker J.M. The biconchonic acid (BCA) assay for protein quantitation // Methods Mol Biol. 1994. Vol. 32. P. 5–8. doi: 10.1385/0-89603-268-X:5.
7. S-Trap™ micro spin column digestion protocol, ProtiFi, <https://files.protifi.com/protocols/s-trap-micro-long-4-7.pdf>, дата обращения 08.10.2024
8. HaileMariam M., Egeuz R. V., Singh H., et al. S-trap, an ultrafast sample-preparation approach for shotgun proteomics // J. Proteome Res. 2018. Vol. 17, N9. P. 2917–2924.
9. Kochneva A., Efremov D., Murzina S.A. Proteins journey—from marine to freshwater ecosystem: blood plasma proteomic profiles of pink salmon *Oncorhynchus gorbusha* Walbaum, 1792 during spawning migration // Front. Physiol. 2023. Vol. 14, P. 1216119.
10. Tyanova S., Temu T., Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics // Nat Protoc. 2016. Vol. 11. P. 2301–2319.

11. *Torrent M., Di Tommaso P., Pulido D., et al.* AMPA: an automated web server for prediction of protein antimicrobial regions // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28, N1. P. 130–1.
12. *Torrent M., Nogués V.M., Boix E.* A theoretical approach to spot active regions in antimicrobial proteins // *BMC Bioinformatics*. 2009. Vol. 10, N 373.
13. *Fernandes J.M., Kemp G.D., Molle M.G., et al.* Antimicrobial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // *Biochem J*. 2002. Vol. 368, NPt 2. P. 611–20.
14. *Fernandes J.M., Molle G., Kemp G.D., et al.* Isolation and characterisation of oncorhynchin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // *Dev Comp Immunol*. 2004. Vol. 28, N2. P. 127–38.
15. *Fu B., Lin H., Ramesh Pavase T., et al.* Extraction, Identification, Modification, and Antibacterial Activity of Histone from Immature Testis of Atlantic salmon // *Mar Drugs*. 2020. Vol. 18, N3, P. 133.
16. *Liu Q.H., Zhang S.C., Li Z.J., et al.* Characterization of a pattern recognition molecule vitellogenin from carp (*Cyprinus carpio*) // *Immunobiology*. 2009. Vol. 214, N4. P. 257–67.
17. *Puthia M., Marzinek J.K., Petruk G., et al.* Antibacterial and Anti-Inflammatory Effects of Apolipoprotein E // *Biomedicines*. 2022. Vol. 10, N6. P. 1430.
18. *Jafari H., Lista A., Siekapen M.M., et al.* Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering // *Polymers (Basel)*. 2020. Vol. 12, N10. P. 2230.
19. *Wei X., Wu Z., Zhang T., et al.* Functional characterization of complement factor H in host defense against bacterial pathogen in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) // *Fish Shellfish Immunol*. 2022. Vol. 129. P. 114–126.

IDENTIFICATION *IN SILICO* OF ANTIMICROBIAL SEQUENCES OF RAINBOW TROUT BRAIN PROTEINS IN THE CONTEXT OF INTEGRATED IN THE CONTEXT OF COMPLEX RECYCLING OF AQUACULTURE WASTES

A. A. Kochneva*, A. E. Kuritsin, S. A. Murzina

Presented by Academician of the RAS N. N. Nemova

Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

*e-mail: kochnevaalbina@gmail.com

Aquaculture is one of the main suppliers of fishery products and maintain its sustainable growth in the world, exceeding industrial fishing. At the same time, the problem of integrated processing of aquaculture by-products is on the environmental and production agenda. Fish processing by-products, which remains after obtaining the target product (fillet, offal, etc.), can be a “supplier” of valuable biological components. In particular, fish express antimicrobial peptides that exhibit broad-spectrum antimicrobial activity. In this study, we performed the first exploratory analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* brain proteins to identify theoretical antimicrobial patterns. More than half of the identified proteins were predicted to have antimicrobial regions. These proteins included histones, vitellogenin, collagen and others. The obtained results may prove to be of interest in the context of drug development based on peptides against various pathogens, which is a relevant direction against the backdrop of increasing antibiotic resistance of pathogenic microorganisms.

Keywords: rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, antimicrobial peptide, brain