

[https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.2\(51\).268553](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.2(51).268553)

УДК 575.17:575.113.1:594.124

І. Ю. Чубик¹, аспірантка

С. В. Чеботар^{1,2}, д. б. н., професор

¹Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, біологічний факультет, кафедра молекулярної біології, біохімії та генетики, Одеса, вул. Дворянська, 2, 65082, Україна, e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua

²Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення, Одеса, Овідіопольська дор., 3, 65036, Україна

БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ АДГЕЗИВНОГО БІЛКА СТОПИ МІДІЙ РОДУ *MYTILUS*

Проведено біоінформатичний аналіз нуклеотидних послідовностей «варіабельної області» генів адгезивного білка стопи мідій. Показано наявність в цій області мутацій, які дозволяють розрізнити між собою чотири види мідій: *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. trossulus*. Використовуючи методи біоінформатики, проведено аналіз первинної та вторинної структури адгезивного білка мідії виду *M. galloprovincialis*, характерного для Чорноморського регіону, та побудовано модель тривимірної структури для зазначеного білка.

Ключові слова: *Mytilus*; ген *Fp1*; адгезивний білок мідій; молекулярний маркер *Me 15–16*; біоінформатичний аналіз

Різноманітні водні безхребетні тварини для прикріплення під водою виділяють клейкі субстанції, що містять адгезивні білки. На даний час, найбільш вивчений механізм молекулярної адгезії білків стопи мідій – двостулкових молюсків роду *Mytilus* [1].

Підводна адгезія є важливою адаптацією для сидячих морських організмів, яка біохімічно формувалася протягом мільйонів років. Двостулкові молюски, такі, як мідія, здатні виробляти клейкоподібний матеріал, відомий як бісус, утворений білками стопи мідії (Mussel foot proteins, Mfps). Бісус складається, в основному, з чотирьох частин, а саме: бляшки, нитки, стебла та кореня. Окремі нитки проксимально зливаються разом, утворюючи стебло та основу стебла (кореня), глибоко закріпленого в основі ноги молюска. Кожна бісусна нитка закінчується дистально сплющеним нальотом, який опосередковує адгезію до субстрату [4, 6, 8, 9]. Кожна частина комплексу бісусних ниток утворюється в результаті самоскладання секреторних продуктів, що походять з чотирьох окремих залоз, укладених у ніжку мідії [9, 16].

Адгезивні білки стопи мідій (Mfps) мають здатність зв'язувати різноманітний субстрат за допомогою адгезивних бляшок. Основним компонентом в Mfps є 3,4-дигідроксифенілаланін (ДОФА), який утворюється в результаті

посттрансляційного гідроксилювання тирозину. Під час цієї посттрансляційної модифікації, поліфенолоксидази каталізують о-гідроксилювання монофенолів (тироzinу) до о-дифенолів (ДОФА). Кількість ДОФА впливає на адгезивну здатність Mfps [6, 16, 23, 25].

Відомо [2], що адгезивний наліт містить щонайменше шість окремих білків: Mefp-1, Mefp-2, Mefp-3, Mefp-4, Mefp-5, Mefp-6. Перші п'ять були виділені з *Mytilus edulis* та характерні і для інших представників мідій: *Mytilus californicus*, *Mytilus galloprovincialis* та *Mytilus coruscus*. В той же час Mefp-6 виділений тільки з *Mytilus californicus* [2, 25].

За даними Anand et al. [1] в базі даних NCBI [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>] для роду *Mytilus* доступно 65 послідовностей Mfps. Серед них 34 Mfps у *Mytilus californianus* Conrad, 1837; 26 у *Mytilus unguiculatus* Valenciennes, 1858 (синонім *Mytilus coruscus* Gould, 1861); три у *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819; два у *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758. Наукові назви видів мідій були підтверджені у Світовому реєстрі морських видів (WoRMS) [<http://www.marinespecies.org/index.php>].

Починаючи із середини 1990-х років в дослідження біорізноманіття мідій активно залучали молекулярно-генетичні методи, які базувались на широкому спектрі маркерних систем, розроблених до гена поліфенольного адгезивного білка стопи мідій. Inoue et al. [10] розробили набір праймерів (*Me 15 / Me 16*) для генетичної ідентифікації трьох видів мідій (*M. edulis*, *M. trossulus* і *M. galloprovincialis*), а Santaclara et al. [19] з використанням молекулярного маркера *Me 15–16* та рестрикційного ферменту *Aci I* змогли відрізнити *M. chilensis* від *M. galloprovincialis* Північної півкулі. Rawson et al. [18] розробили молекулярні маркери для *Glu* гена: *Glu-5'*, який дозволяє ідентифікувати три види мідій Північної півкулі: *M. edulis*, *M. galloprovincialis* і *M. trossulus*, та *Glu-3'*, який відрізняє *M. edulis* від *M. galloprovincialis*. Fernández-Tajes et al. [5] використовували праймери *Myti-F/R* та подальше розщеплення рестрикційними ферментами (*Aci I* та *Acl I*) для диференціації комерційних видів *Mytilus*, тоді як Jilberto et al. [11] використовували пару праймерів PARM F/R з подальшим аналізом плавлення з високою роздільною здатністю (High resolution melting analysis) для диференціації *M. chilensis*, *M. edulis* та *M. galloprovincialis* та їх гібридів. Відзначається [13], що розроблені молекулярні маркери: *Me 15–16*, *Glu-5'*, *Myti* та PARM – націлені на одну й ту саму область в гені адгезивного білка стопи мідій.

В попередніх дослідженнях нами було використано молекулярний маркер *Me 15–16* (до неповторюваної області гена *Fp1* адгезивного білка мідій) для встановлення видової приналежності представників угруповань мідій Чорного моря [3].

Метою даної роботи є порівняння нуклеотидних послідовностей, які фланкуються праймерами *Me 15 / Me 16*, середземноморської мідії *M. galloprovincialis* з іншими видами мідій за допомогою методів біоінформатики, а також аналіз гена *Fp1* та структури адгезивного білка стопи Mefp-1 мідії виду *M. galloprovincialis*, що доволі поширена в Чорному морі.

Матеріали і методи дослідження

Пошук нуклеотидних послідовностей генів адгезивного білка стопи мідій, представлених в базі даних GenBank (NCBI [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>]), проведено за алгоритмом BLAST. Як пошуковий запит використовували послідовність *M. trossulus* (D50553), яка була вказана розробниками праймерів *Me 15 / Me 16* [10]. Обрані послідовності наведені в табл. 1.

Мультиплексне вирівнювання взятих в роботу послідовностей проводили за допомогою алгоритму MAFFT [15]. Філогенетичне дерево було побудоване у програмному забезпеченні MEGA [12] із застосуванням методу UPGMA [20].

Для пошуку повної амінокислотної послідовності адгезивного білка стопи мідії середземноморської *M. galloprovincialis*, який кодується геном *Fp1*, використовували сервер UniProt [<https://www.uniprot.org>]. Фізико-хімічні параметри адгезивного білка для знайденої послідовності розраховували за допомогою програмного інструменту ProtParam (ExpASy [<https://web.expasy.org/protparam/>]).

На онлайн-платформі I-TASSER [22, 24] із обраної на сервері UniProt амінокислотної послідовності (Q27409) була побудована модель тривимірної структури гена адгезивного білка стопи мідії. Сервер I-TASSER дозволяє виявити білки-шаблони зі схожими складками (або супервторинними структурами) з бібліотеки PDB за допомогою LOMETS, локально встановленого методу метапотоків. Повнорозмірні моделі структури білка будуються шляхом повторної збірки структурних фрагментів із шаблонів з використанням обміну репліками за допомогою моделювання Монте-Карло. Побудовану тривимірну модель структури досліджуваного білка за допомогою серверу I-TASSER було порівняно з моделлю спрогнозованою програмою AlphaFold [<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q27409>].

Результати дослідження та їх обговорення

Для проведення ідентифікації чотирьох видів мідій в роді *Mytilus* використовують молекулярний маркер *Me 15–16* та рестракційний фермент *Aci I* [19], які націлені на ген поліфенольного адгезивного білка, продукуючи продукти ПЛР довжиною 180 п.н. для *M. edulis*, 168 п.н. для *M. trossulus* та 126 п.н. для *M. chilensis* і *M. galloprovincialis*. Для того, щоб розрізнити *M. chilensis* і *M. galloprovincialis* за даним маркером, додатково використовують рестракційний фермент *Aci I*, який розрізає амплікони довжиною 126 п.н. на фрагменти 69 п.н. та 57 п.н. у *M. galloprovincialis*, залишаючи амплікон *M. chilensis* нерозрізаним через наявність точкової мутації в нуклеотидній послідовності, яка видаляє сайт *Aci I* [19]. У роботі Larraín et al. [14] було показано, що фермент *Aci I* розрізає амплікон 126 п.н. виду *M. galloprovincialis* на фрагменти 75 п.н. та 51 п.н., передбачалось, що досліджувані особини мідій можуть бути гібридами *M. chilensis* × *M. galloprovincialis*. Також, було описано фрагменти

Таблиця 1

Характеристика нуклеотидних послідовностей взятих в роботу

| № п/п | Організм | Ідентифікатор у базі даних NCBI (ID) | Назва послідовності | Ділянка гена | Довжина, п. н. |
|-------|-----------------------------|--------------------------------------|---|--------------|----------------|
| 1. | <i>M. galloprovincialis</i> | HQ257469 | 13 ген поліфенольного адгезивного білка стопи | Часткова | 126 |
| 2. | <i>Mytilus</i> sp. JHX-2002 | AF489933 | мРНК попередника білка адгезивного нальоту | Повна | 726 |
| 3. | <i>M. galloprovincialis</i> | D63778 | мРНК білка адгезивного нальоту | Повна | 2502 |
| 4. | <i>M. galloprovincialis</i> | KY549937 | Ген адгезивного білка <i>Mytilus</i> SPT16 | Часткова | 159 |
| 5. | <i>M. galloprovincialis</i> | HQ257459 | 29 ген поліфенольного адгезивного білка стопи | Часткова | 126 |
| 6. | <i>M. galloprovincialis</i> | KY549938 | Ген адгезивного білка <i>Mytilus</i> SPT6 | Часткова | 159 |
| 7. | <i>M. galloprovincialis</i> | HQ257470 | 11 ген поліфенольного адгезивного білка стопи | Часткова | 126 |
| 8. | <i>M. galloprovincialis</i> | HQ257468 | 6 ген поліфенольного адгезивного білка стопи | Часткова | 126 |
| 9. | <i>M. galloprovincialis</i> | DQ640590 | Ген поліфенольного адгезивного білка MgI1 | Часткова | 102 |
| 10. | <i>M. chilensis</i> | DQ640601 | Ген поліфенольного адгезивного білка McI1 | Часткова | 102 |
| 11. | <i>M. edulis</i> | KY549934 | Ген адгезивного білка <i>Mytilus</i> H23 | Часткова | 213 |
| 12. | <i>M. edulis</i> | AY845258 | мРНК клону 21 гену білка стопи 1 (fp-1). | Повна | 1698 |
| 13. | <i>M. edulis</i> | KY549936 | Ген адгезивного білка <i>Mytilus</i> H12 | Часткова | 213 |
| 14. | <i>M. edulis</i> | X54422 | Ген поліфенольного адгезивного білка | Повна | 4636 |
| 15. | <i>M. edulis</i> | DQ640586 | Ген поліфенольного адгезивного білка MeII2 | Часткова | 134 |
| 16. | <i>M. edulis</i> | DQ640587 | Ген поліфенольного адгезивного білка MeIII4 | Часткова | 134 |
| 17. | <i>M. trossulus</i> | KY549940 | Ген адгезивного білка <i>Mytilus</i> SC8 | Часткова | 201 |
| 18. | <i>M. californianus</i> | AY960602 | Ген білка стопи 1 варіант 2 мРНК | Повна | 2019 |
| 19. | <i>M. californianus</i> | AY960601 | Ген білка стопи 1 варіант 1 мРНК | Повна | 2199 |
| 20. | <i>M. coruscus</i> | D63777 | мРНК білка матриці адгезивної бляшки | Повна | 2816 |
| 21. | <i>M. trossulus</i> | D50553 | Ген адгезивного білка | Часткова | 122 |

розміром 77 п. н. та 49 п. н. [21], у північного виду *M. galloprovincialis*. Різниця, що спостерігається в розмірах розрізаних фрагментів, ймовірно, пов'язана з різними методами, які використовувалися для оцінки розміру (секвенування в порівнянні з електрофорезом у 8% поліакриламідному гелі).

Для кращого розуміння, яким чином використання праймерів *Me 15–16* дозволяє розрізнити видову приналежність мідій, ми провели порівняльний аналіз повних і часткових нуклеотидних послідовностей, «варіабельної області» генів адгезивного білка стопи мідій знайдених в базі даних GenBank, приклад наведено на рис. 1.

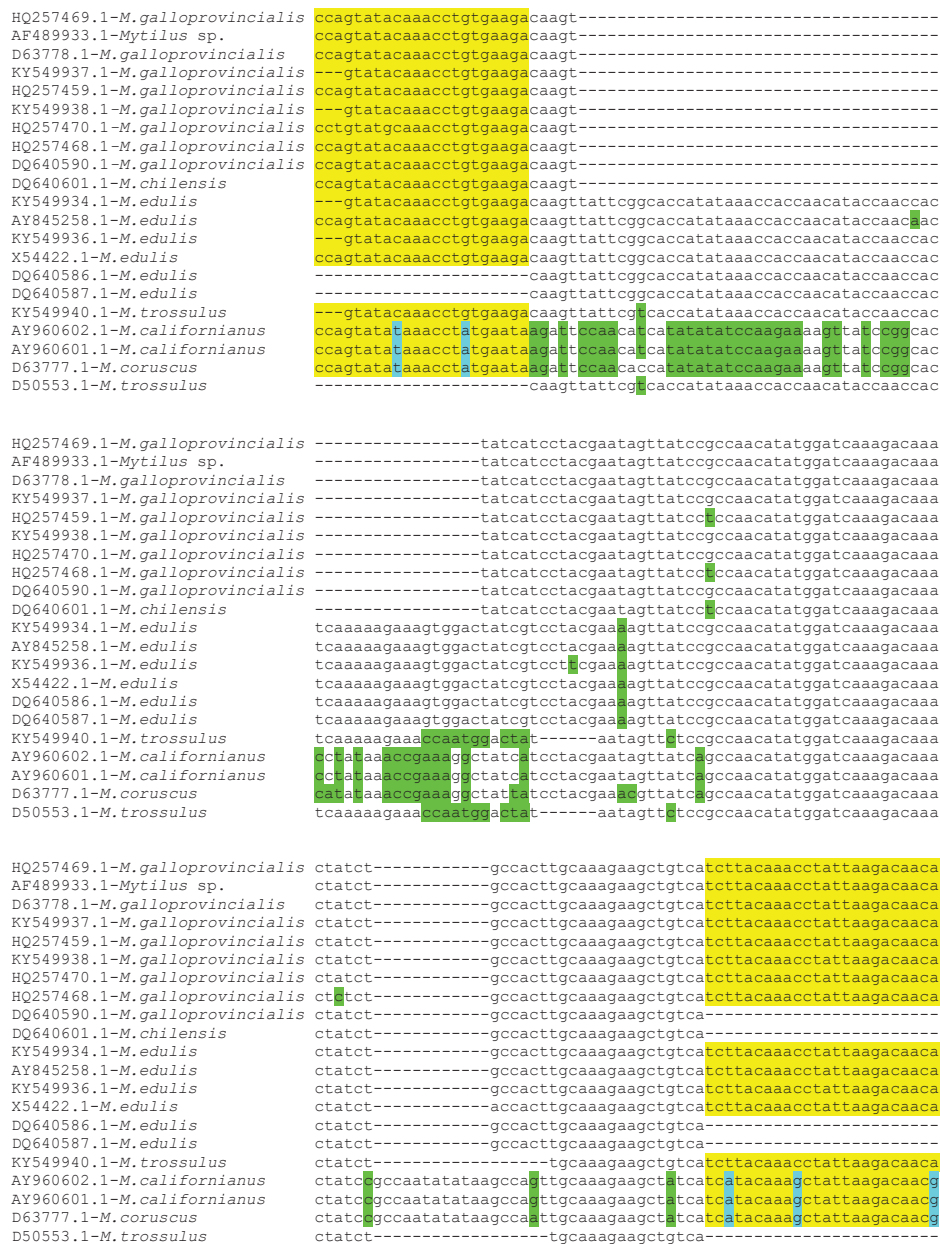
Показана на рис. 1 область, яка обмежується парою праймерів *Me 15 / Me 16* відрізняється у різних видів мідій наявністю делецій та однонуклеотидних поліморфізмів (SNP), і в літературі [10] називається «варіабельною областю».

При множинному вирівнюванні 21 нуклеотидної послідовності «варіабельної області» виявлено наявність трьох делецій. Перша делеція була розміром 54 п. н. і зустрічалася в послідовностях *M. galloprovincialis* та *M. chilensis*. Друга делеція була розміром 6 п. н. і зустрічалася у виду *M. trossulus*. Третя делеція мала два розміри – 12 п. н. і 18 п. н., і зустрічалася в послідовностях чотирьох видів мідій: *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. trossulus*. Делеція розміром 18 п. н. була характерна тільки для *M. trossulus*. У послідовностях видів *M. californianus*, *M. coruscus* в досліджуваній області наявність делецій відсутня.

Серед дев'яти досліджених нуклеотидних послідовностей «варіабельної області» представлених для *M. galloprovincialis*, у двох з них – HQ257459 і HQ257468 з Нової Зеландії, зустрічається SNP. Такий же SNP (заміна нуклеотиду G на T) в одному і тому самому локусі характерний для *M. chilensis*, рис. 1. Шість послідовностей *M. edulis* характеризувалися наявністю однакових SNP (заміна нуклеотиду T на A). Також, зустрічається ще по одному SNP в послідовностях AY845258 і KY549936, які є не характерними для інших послідовностей *M. edulis*. Дві короткі послідовності *M. trossulus* характеризувалися наявністю SNP, частина з яких була спільна з послідовностями *M. californianus* і *M. coruscus*, рис. 1. У видів *M. californianus* та *M. coruscus* послідовність, яка відповідає праймерам *Me 15 / Me 16*, характеризується наявністю SNP. Тому, дані праймери не підходять для ідентифікації зазначених видів мідій. «Варіабельна область» видів *M. californianus* та *M. coruscus* значною мірою відрізняється від інших видів мідій за рядом SNP.

SNP, які простежуються у досліджуваних видів мідій, дозволяють говорити про спостережувану гомологічну мінливість: чим більша подібність гомологічних генів у хромосомах споріднених видів мідій, тим еволюційно більш близькими є види, які порівнюються.

Використовуючи знайдені послідовності у програмі MEGA було побудовано дендрограму, що представлена на рис. 2.



Кольором позначено:

- послідовності праймерів *Me 15 / Me 16* до гену адгезивного білка стопи мідії;
- SNP в праймерах *Me 15 / Me 16*;
- SNP в гені адгезивного білка стопи різних видів мідій, що фланкується парою праймерів *Me 15 / Me 16*.

*Рис. 1. Фрагмент мультиплексного вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів адгезивного білка стопи представників роду *Mytilus*, здійснене за алгоритмом MAFFT.*



Рис. 2. Дендрограма, побудована методом незалежного парного порогового кластерного аналізу UPGMA на основі генетичних дистанцій між нуклеотидними послідовностями адгезивного білка стопи мідій роду *Mytilus*. Числа на схемі – бутстреп індекс.

Представлена на рис. 2 дендрограма відображає філогенетичні відношення видів мідій в роді *Mytilus*, виявлені при порівнянні нуклеотидних послідовностей генів адгезивного білка стопи двостулкових моллюсків. Дендрограма розділилася на два кластери – один більший, складала послідовності видів: *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. trossulus*; у другий увійшли – *M. californianus* та *M. coruscus* (відсоток спорідненості – 77%). Більший кластер утворює два субкластера відокремлюючи *M. galloprovincialis* і *M. chilensis* (відсоток спорідненості – 32%) від *M. edulis* і *M. trossulus* (відсоток спорідненості – 28%). Отриманий розподіл представників роду *Mytilus* за допомогою кластерного аналізу узгоджується із даними літератури щодо географічного поширення цих видів, які демонструють антитропічне розповсюдження: *M. trossulus*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus* і *M. coruscus* зустрічаються в Північній півкулі; інтродукований вид *M. galloprovincialis* і *M. chilensis* – в Південній півкулі [7]. За даними філогенії [17], побудованої на основі варіації послідовності мітохондріального гену *COI*, також було виявлено більшу подібність між *M. californianus* і *M. coruscus*, та серед трьох видів: *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus*.

Другим етапом нашої роботи був аналіз первинної та вторинної структури адгезивного білка *M. galloprovincialis* поширеної в Чорному морі.

На сервері UniProt для виду *M. galloprovincialis* було знайдено повну амінокислотну послідовність адгезивного білка стопи Mefp-1 довжиною 751 амінокислота (Q27409), який кодується геном *Fpl*. Для даної послідовності за допомогою програмного інструменту ProtParam, розміщеного на сервері ExPASy, було розраховано молекулярну масу адгезивного білка – 85,791 Да та показано значне переважання в амінокислотній послідовності проліну (24,1%), лізину (19,2%) і тирозину (19%), а також серину (12%) і треоніну (10,4%).

Доцільність прогнозованих білкових моделей залежить від точності передбачення структури. Використаний в нашій роботі сервер I-TASSER був визнаний сервером № 1 для прогнозування структури білка в експериментах з критичного аналізу методів для структурних передбачень білків (CASP). Сервер постійно знаходиться в активній розробці для забезпечення найточнішого прогнозування структури та функції білка за допомогою найсучасніших алгоритмів.

За допомогою сервера I-TASSER була спрогнозована вторинна структура адгезивного білка *M. galloprovincialis* (Q27409). Слід зазначити, що I-TASSER було запропоновано п'ять моделей просторової структури адгезивного білка *M. galloprovincialis*. Приклад найбільш ймовірної тривимірної моделі даного білка представлено на рис. 3.

Як ми бачимо, в моделі присутні ділянки зі структурою альфа-спіралі і β -складчатою структурою, також виявлено неструктуровані ділянки. Для оцінки якості прогнозованих моделей I-TASSER використовують С-показник, який розраховується на основі значущості вирівнювання послідовності запиту відносно послідовності шаблону та параметрів конвергенції структури

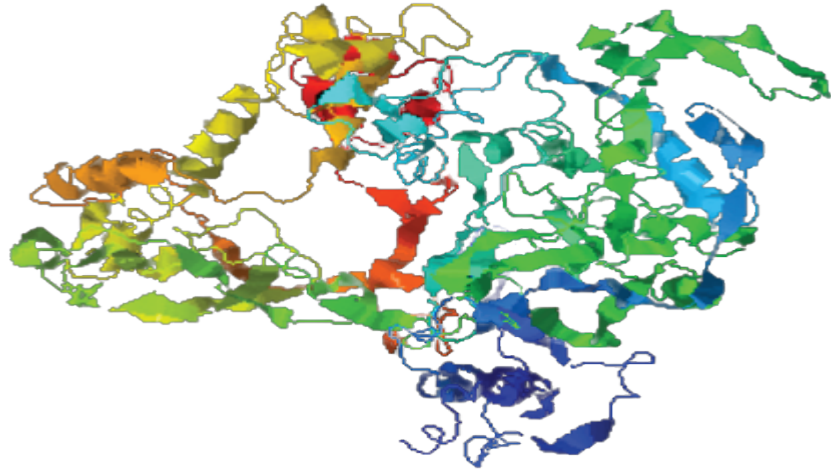


Рис. 3. Тривимірна модель адгезивного білка *M. galloprovincialis*, отримана за допомогою сервера I-TASSER.

моделювання складання [22]. Загалом, моделі з С-показником $> -1,5$ мають правильну складку. Отримані нами значення С-показника ($-0,70$), ТМ-оцінки ($0,62 \pm 0,14$), RMSD ($9,9 \pm 4,6$) та щільності кластера ($0,2897$) для представленої моделі адгезивного білка *M. galloprovincialis* вказують на модель правильної глобальної топології.

Побудована тривимірна модель структури досліджуваного білка за допомогою серверу I-TASSER характеризувалася більшою достовірністю порівняно з моделлю спрогнозованою програмою AlphaFold. Спрогнозована програмою AlphaFold просторова структура адгезивного білка *M. galloprovincialis* характеризувалася низькими показниками достовірності, що на певних ділянках знаходилися в межах $50 < pLDDT < 70$ або навіть нижче. В зв'язку з цим, ми надали перевагу моделі, спрогнозованій сервером I-TASSER.

Висновки

Досліджувані нуклеотидні послідовності шести представників роду *Mytilus*, у межах «варіабельної області» гена *Fp1* адгезивного білка, відрізняються у різних видів мідій наявністю делецій та ряду однонуклеотидних поліморфізмів. Проведений кластерний аналіз зазначених послідовностей, свідчить про наявну мінливість на нуклеотидному рівні у представників роду *Mytilus* з окремих популяцій. За результатами біоінформатичного аналізу було визначено молекулярну масу та побудовано модель просторової структури адгезивного білка стопи *Mefp-1*, що кодується *Fp1* геном, для виду *M. galloprovincialis*.

Стаття надійшла до редакції 21.10.2022

Список використаної літератури

- Anand P.P. Computational modelling of wet adhesive mussel foot proteins (Bivalvia): Insights into the evolutionary convolution in diverse perspectives / P.P. Anand, Y.S. Vardhanan // Sci. Rep.– 2020.– Vol. 10.– 2612. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59169-y>.
- Bandara N. Marine mussel adhesion: biochemistry, mechanisms, and biomimetics / N. Bandara, H. Zeng, J. Wu // J. Adhes. Sci. Technol.– 2013.– Vol. 27(18–19).– P. 2139–2162. doi: <https://doi.org/10.1080/01694243.2012.697703>.
- Chubyk I. Species affiliation of the North-Western region of the Black Sea mussels based on the results of molecular-genetic analysis // I. Chubyk, G. Chebotar, A. Bick, S. Chebotar // Hydrob. J.– 2022.– Vol. 58(3).– P. 68–75. doi: [10.1615/HydrobJ.v58.i3.60](https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v58.i3.60).
- DeMartini D. G. A cohort of new adhesive proteins identified from transcriptomic analysis of mussel foot glands // D.G. DeMartini, J.M. Errico, S. Sjoestroem, A. Fenster, H. Waite // J. R. Soc. Interface.– 2017.– Vol. 14(131).– 20170151. doi: [10.1098/rsif.2017.0151](https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0151).
- Fernández-Tajes J. Alternative PCR–RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification / J. Fernández-Tajes, A. Longa, J. García-Gil, Y. W. Chiu, Y. S. Huang, J. Méndez, R. S. Lee // Eur. Food Res. Technol.– 2011.– Vol. 233(5). P. 791–796. doi: [10.1007/s00217-011-1574-x](https://doi.org/10.1007/s00217-011-1574-x).
- Forooshani P.K. Recent approaches in designing bio-adhesive materials inspired by mussel adhesive protein / P.K. Forooshani, B. P. Lee // Poly. Chem.– 2016.– Vol. 55.– P. 9–33. doi: <https://doi.org/10.1002/pola.28368>.
- Gaitán-Espitia J.D. Mitogenomics of Southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Pteriomorpha): Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex / J.D. Gaitán-Espitia, J.F. Quintero-Galvis, A. Mesas, G. D'Elia // Sci. Res.– 2016.– Vol. 6.– 26853. doi: [10.1038/srep26853](https://doi.org/10.1038/srep26853).
- Harper E. The evolutionary biology of the Bivalvia / E.M. Harper, J.D. Taylor, A. Crame // Geological Society of London, 2000.– Vol. 177.– P. 494. doi: <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2000.177>.
- Hennebert E. Experimental strategies for the identification and characterization of adhesive proteins in animals: a review / E. Hennebert, B. Maldonado, P. Ladurner, P. Flammang, R. Santos // Interface Focus.– 2015.– Vol. 5.– 20140064. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rsfs.2014.0064>.
- Inoue K. Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *M. trossulus* / K. Inoue, J.H. Waite, M. Matsuoka, S. Odo, S. Harayama // Biol. Bull.– 1995.– Vol. 189(3).– P. 370–375. doi: [10.2307/1542155](https://doi.org/10.2307/1542155).
- Jilberto F. High resolution melting analysis for identification of commercially-important *Mytilus* species / F. Jilberto, C. Araneda, M.A. Larraín // Food Chem.– 2017.– Vol. 229.– P. 716–720. doi: [10.1016/j.foodchem.2017.02.109](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.109).
- Kumar S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // Mol. Biol. Evol.– 2018.– Vol. 35(6).– P. 1547–1549. doi: [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096).
- Larraín M.A. Comparison between single and multi-locus approaches for specimen identification in *Mytilus* mussels / M.A. Larraín, P. González, C. Pérez, C. Araneda // Sci. Rep.– 2019.– Vol. 9.– 19714. doi: [10.1038/s41598-019-55855-8](https://doi.org/10.1038/s41598-019-55855-8).
- Larraín M.A. Genetic composition of *Mytilus* species in mussel populations from southern Chile / M.A. Larraín, N.F. Diaz, C. Lamas, C. Vargas, C. Araneda // Lat. Am. J. Aquat. Res.– 2012.– Vol. 40(4).– P. 1077–1084. doi: <http://dx.doi.org/10.3856/vol40-issue4-fulltext-23>.
- Madeira F. The EMBL–EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019 / F. Madeira, Y. Park, J. Lee, N. Buso, T. Gur, N. Madhusoodanan, P. Basutkar, A. R. N. Tivey, S. C. Potter, R. D. Finn, R. Lopez // Nucleic Acids Res.– 2019.– Vol. 47.– P. 636–641. doi: [10.1093/nar/gkz268](https://doi.org/10.1093/nar/gkz268).
- Maier G.P. Adaptive synergy between catechol and lysine promotes wet adhesion by surface salt displacement / G.P. Maier, M. V. Rapp, J.H. Waite, J.N. Israelachvili, A. Butler // Science.– 2015.– Vol. 349(6248).– P. 628–632. doi: [10.1126/science.aab0556](https://doi.org/10.1126/science.aab0556).
- Oyarzún P.A. Blue mussels of the *Mytilus edulis* species complex from South America: The application of species delimitation models to DNA sequence variation / P.A. Oyarzún, J.E. Toro, J.J. Nuñez, E.Y. Suárez-Villota, J. P.A. Gardner // PLoS ONE.– 2021.– Vol. 16(9).– e0256961. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256961>.

18. Rawson P.D. Evidence for intragenic recombination within a novel genetic marker that distinguishes mussels in the *Mytilus edulis* species complex / P.D. Rawson, K.L. Joyner, K. Meetze, T.J. Hilbush // *Heredity*. – 1996. – Vol. 77(6). – P. 599–607. doi: 10.1038/hdy.1996.187.
19. Santaclara F.J. Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera / F.J. Santaclara, M. Espiñeira, A.G. Cabado, A. Aldasoro, N. Gonzalez-Lavin, J.M. Vieites // *J. Agric. Food Chem.* – 2006. – Vol. 54. – P. 8461–8470. doi: 10.1021/jf061400u.
20. Sneath P. H.A. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification / P. H.A. Sneath, R. R. Sokal // San Francisco: Freeman, 1973. – P. 573.
21. Westfall K. M. Interlineage *Mytilus galloprovincialis* Lmk. 1819 hybridization 438 yields inconsistent genetic outcomes in the Southern hemisphere / K.M. Westfall, J.P. Gardner // *Biol. Invasions*. – 2013. – Vol. 15(7). – P. 1493–1506. doi: 10.1007/s10530-012-0385-8.
22. Yang J. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions / J. Yang, Y. Zhang // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 43. – P. 174–181. doi: 10.1093/nar/gkv342.
23. Yu J. Mussel protein adhesion depends on interprotein thiol-mediated redox modulation / J. Yu, W. Wei, E. Danner, R. K. Ashley, J.N. Israelachvili, J.H. Waite // *Nat. Chem. Biol.* – 2011. – Vol. 7(9). – P. 588–590. doi: 10.1038/nchembio.630.
24. Zhang C. Template-based and free modeling of I-TASSER and QUARK pipelines using predicted contact maps in CASP12 / C. Zhang, S. M. Mortuza, B. He, Y. Wang, Y. Zhang // *Proteins*. – 2018. – 86 Suppl. 1 (Suppl. 1). – P. 136–151. doi: 10.1002/prot.25414.
25. Zhao H. Linking adhesive and structural proteins in the attachment plaque of *Mytilus californianus* // H. Zhao, J.H. Waite // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281(36). – P. 26150–26158. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M604357200>.

І.Ю. Чубик¹, С.В. Чеботар^{1,2}

¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, біологічний факультет, кафедра молекулярної біології, біохімії та генетики, Одеса, вул. Дворянська, 2, 65082, Україна, e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua

²Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Одеса, Овідіопольська дор., 3, 65036, Україна.

БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ АДГЕЗИВНОГО БІЛКА СТОПИ МІДІЙ РОДУ *MYTILUS*

Резюме

Проблема. На сьогоднішній день є актуальною ідентифікація та дослідження генів адгезивних білків, які сприяють адгезії морських мідій під водою та відіграють важливу роль у промисловості для комерціалізації водонепроникних клеїв. Мета нашого дослідження заснована на біоінформатичному аналізі, тому як моделювання в даний час є одним з передових методів.

Мета. Метою даної роботи було провести порівняння нуклеотидних послідовностей представників роду *Mytilus*, які фланкуються праймерами *Me 15*/*Me 16*, розробленими до неповторювальної області гена адгезивного білка мідій, а також біоінформатичний аналіз повної амінокислотної послідовності адгезивного білка стопи *MeFr-1*, що кодується геном *Fp1*, для виду *M. galloprovincialis*.

Методика. Нуклеотидні послідовності аналізували за допомогою BLAST (NCBI [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>]) та вирівнювали MAFFT [Madeira et al., 2019] методами. Філогенетичне дерево побудували у програмі MEGA [Kumar et al., 2018] методом UPGMA [Sneath, Sokal, 1973]. Фізико-хімічні параметри адгезивного білка для амінокислотної послідовності *M. galloprovincialis*

розраховували за допомогою програмного інструменту ProtParam (ExpASy [https://web.expasy.org/protparam/]). Моделі тривимірної структури адгезивного білка *M. galloprovincialis* побудовані на онлайн-платформі I-TASSER [Yang, Zhang, 2015; Zhang et al., 2018] та з використанням програми AlphaFold [https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q27409].

Основні результати. Аналіз нуклеотидних послідовностей шести представників роду *Mytilus* в межах «варіабельної області», яка фланкуюється праймерами *Me 15 / Me 16*, показав наявність делецій і ряд однонуклеотидних поліморфізмів. Побудована дендрограма відобразила філогенетичні відношення видів мідій в роді *Mytilus*, при порівнянні нуклеотидних послідовностей генів адгезивного білка стопи мідій. Проведено аналіз первинної та вторинної структури адгезивного білка мідії виду *M. galloprovincialis*, характерної для Чорноморського регіону, та побудовано модель правильної глобальної топології тривимірної структури адгезивного білка для зазначеного виду.

Висновки. Виявлені мутації в досліджуваній «варіабельної області» нуклеотидних послідовностей генів адгезивного білка дозволяють молекулярному маркеру *Me 15–16* розрізняти між собою чотири види мідій: *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. trossulus*. Отриманий розподіл представників роду *Mytilus* за допомогою кластерного аналізу узгоджується із даними літератури щодо територіального поширення цих видів. Розраховано молекулярну масу та побудовано модель просторової структури білка стопи мідії виду *M. galloprovincialis*.

Ключові слова: *Mytilus*; ген *Fp1*; адгезивний білок мідій; молекулярний маркер *Me 15–16*; біоінформатичний аналіз

I. Yu. Chubyk¹, S. V. Chebotar^{1,2}

¹Odesa I. I. Mechnikov National University, Department of Molecular Biology, Biochemistry and Genetics, 2 Dvorianska Str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua

²Plant Breeding and Genetic Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, 3 Ovidiopska Doroha, Odesa, 65036, Ukraine.

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF GENES OF ADHESIVE PROTEIN FOOT OF MUSSELS OF THE GENUS *MYTILUS*

Abstract

Introduction. Today, it is relevant to identify and study the genes of adhesive proteins that contribute to the adhesion of marine mussels under water and play an important role in the industry for the commercialization of waterproof adhesives. The purpose of our research is based on bioinformatic analysis, because modeling is currently one of the advanced methods.

Aim. The purpose of this work was to compare the nucleotide sequences of representatives of the genus *Mytilus*, which are flanked by primers *Me 15 / Me 16*, designed for the non-repetitive region of the mussel adhesive protein gene, as well as bioinformatic analysis of the complete amino acid sequence of the foot adhesive protein Mefp-1, coded by *Fp1* gene by *Fp1* gene, for *M. galloprovincialis*.

Methods. Nucleotide sequences were analyzed using BLAST (NCBI [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>]) and aligned by MAFFT [Madeira et al., 2019] methods. The phylogenetic tree was built in the MEGA program [Kumar et al., 2018] using the UPGMA method [Sneath, Sokal, 1973]. The physicochemical parameters of the adhesive protein for the amino acid sequence of *M. galloprovincialis* were calculated using the ProtParam software tool (ExPASy [<https://web.expasy.org/protparam/>]). Models of the three-dimensional structure of the *M. galloprovincialis* adhesive protein were built on the I-TASSER online platform [Yang, Zhang, 2015; Zhang et al., 2018] and with application of the AlphaFold program [<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q27409>].

The main results. The analysis of the nucleotide sequences of six representatives of the genus *Mytilus* within the «variable region» flanked by primers *Me 15 / Me 16* showed the presence of deletions and a number of SNPs. The constructed dendrogram reflected the phylogenetic relationships of mussel species in the genus *Mytilus*, when comparing the nucleotide sequences of the genes of the adhesive protein of the mussel foot. An analysis of the primary and secondary structure of the adhesive protein of the mussel species *M. galloprovincialis* characteristic of the Black Sea region was carried out, and model of the three-dimensional structure with correct global topology of the adhesive protein for the specified species was built.

Conclusions. The detected mutations in the studied «variable region» of the nucleotide sequences of the adhesive protein genes allow the molecular marker *Me 15–16* to distinguish between four types of mussels: *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. trossulus*. The obtained distribution of representatives of the genus *Mytilus* by means of cluster analysis is consistent with the literature data on the territorial distribution of these species. The molecular weight was calculated and model of the foot adhesive protein of the mussel species *M. galloprovincialis* was constructed.

Key words: *Mytilus*; gene *Fp1*; adhesive protein of mussels; molecular marker *Me 15–16*; bioinformatic analysis

References

1. Anand P. P., Vardhanan Y. S. (2020) «Computational modelling of wet adhesive mussel foot proteins (Bivalvia): Insights into the evolutionary convolution in diverse perspectives», *Sci. Rep.*, 10, 2612. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59169-y>.
2. Bandara N., Zeng H., Wu J. (2013) «Marine mussel adhesion: biochemistry, mechanisms, and biomimetics», *J. Adhes. Sci. Technol.*, 27(18–19), pp 2139–2162, doi: <https://doi.org/10.1080/01694243.2012.697703>.
3. Chubyk I., Chebotar G., Bick A., Chebotar S. (2022) «Species affiliation of the North-Western region of the Black Sea mussels based on the results of molecular-genetic analysis», *Hydrob. J.*, 58(3), pp 68–75. doi: [10.1615/HydrobJ.v58.i3.60](https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v58.i3.60).
4. DeMartini D. G., Errico J. M., Sjoestroem S., Fenster A., Waite H. (2017) «A cohort of new adhesive proteins identified from transcriptomic analysis of mussel foot glands», *J.R. Soc. Interface*, 14(131), 20170151. doi: [10.1098/rsif.2017.0151](https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0151).
5. Fernández-Tajes J., Longa A., García-Gil J., Chiu Y. W., Huang Y. S., Méndez J., Lee R. S. (2011) «Alternative PCR–RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification», *Eur. Food Res. Technol.*, 233(5), pp 791–796. doi: [10.1007/s00217-011-1574-x](https://doi.org/10.1007/s00217-011-1574-x).
6. Forooshani P. K., Lee B. P. (2016) «Recent approaches in designing bio-adhesive materials inspired by mussel adhesive protein», *Poly. Chem.*, 55, pp 9–33. doi: <https://doi.org/10.1002/pola.28368>.
7. Gaitán-Espitia J. D., Quintero-Galvis J. F., Mesas A., D'Elia G. (2016) «Mitogenomics of Southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Pteriomphina): Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex», *Sci. Res.*, 6, 26853. doi: [10.1038/srep26853](https://doi.org/10.1038/srep26853).
8. Harper E., Taylor J. D., Crame A. (2000) «The evolutionary biology of the Bivalvia», Geological Society of London, 177, P. 494. doi: <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2000.177>.

9. Hennebert E., Maldonado B., Ladurner P., Flammang P., Santos R. (2015) Experimental strategies for the identification and characterization of adhesive proteins in animals: a review», *Interface Focus*, 5, 20140064. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rsfs.2014.0064>.
10. Inoue K., Waite J.H., Matsuoka M., Odo S., Harayama S. (1995) «Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *M. trossulus*», *Biol. Bull.*, 189(3), pp 370–375. doi: [10.2307/1542155](https://doi.org/10.2307/1542155).
11. Jilberto F., Araneda C., Larraín M.A. (2017) «High resolution melting analysis for identification of commercially-important *Mytilus* species», *Food Chem.*, 229, pp 716–720. doi: [10.1016/j.foodchem.2017.02.109](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.109).
12. Kumar S., Stecher G., Li M., Niyaz C., Tamura K. (2018) «MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms», *Mol. Biol. Evol.*, 35(6), pp 1547–1549. doi: [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096).
13. Larraín M. A., González P., Pérez C., Araneda C. (2019) «Comparison between single and multi-locus approaches for specimen identification in *Mytilus* mussels», *Sci. Rep.*, 9, 19714. doi: [10.1038/s41598-019-55855-8](https://doi.org/10.1038/s41598-019-55855-8).
14. Larraín M. A., Diaz N.F., Lamas C., Vargas C., Araneda C. (2012) «Genetic composition of *Mytilus* species in mussel populations from southern Chile», *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 40(4), pp 1077–1084. doi: <http://dx.doi.org/10.3856/vol40-issue4-fulltext-23>.
15. Madeira F., Park Y., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A.R. N., Potter S.C., Finn R.D., Lopez R. (2019) «The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019», *Nucleic Acids Res.*, 47, pp 636–641. doi: [10.1093/nar/gkz268](https://doi.org/10.1093/nar/gkz268).
16. Maier G. P., Rapp M.V., Waite J.H., Israelachvili J.N., Butler A. (2015) «Adaptive synergy between catechol and lysine promotes wet adhesion by surface salt displacement», *Science*, 349(6248), pp 628–632. doi: [10.1126/science.aab0556](https://doi.org/10.1126/science.aab0556).
17. Oyarzún P.A., Toro J.E., Nuñez J.J., Suárez-Villota E. Y., Gardner J.P. A. (2021) «Blue mussels of the *Mytilus edulis* species complex from South America: The application of species delimitation models to DNA sequence variation», *PLoS ONE*, 16(9), e0256961. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256961>.
18. Rawson P. D., Joyner K.L., Meetze K., Hilbish T.J. (1996) «Evidence for intragenic recombination within a novel genetic marker that distinguishes mussels in the *Mytilus edulis* species complex», *Heredity*, 77(6), pp 599–607. doi: [10.1038/hdy.1996.187](https://doi.org/10.1038/hdy.1996.187).
19. Santaclara F. J., Espiñeira M., Cabado A. G., Aldasoro A., Gonzalez-Lavin N., Vieites J. M. (2006) «Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera», *J. Agric. Food Chem.*, 54, pp 8461–8470. doi: [10.1021/jf061400u](https://doi.org/10.1021/jf061400u).
20. Sneath P. H. A., Sokal R.R. (1973) «Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification», San Francisco: Freeman, 1973. P. 573.
21. Westfall K. M., Gardner J.P. (2013) «Interlineage *Mytilus galloprovincialis* Lmk. 1819 hybridization 438 yields inconsistent genetic outcomes in the Southern hemisphere», *Biol. Invasions*, 15(7), pp 1493–1506. doi: [10.1007/s10530-012-0385-8](https://doi.org/10.1007/s10530-012-0385-8).
22. Yang J., Zhang Y. (2015) «I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions», *Nucleic Acids Res.*, 43, pp 174–181. doi: [10.1093/nar/gkv342](https://doi.org/10.1093/nar/gkv342).
23. Yu J., Wei W., Danner E., Ashley R.K., Israelachvili J.N., Waite J.H. (2011) «Mussel protein adhesion depends on interprotein thiol-mediated redox modulation», *Nat. Chem. Biol.*, 7(9), pp 588–590. doi: [10.1038/nchembio.630](https://doi.org/10.1038/nchembio.630).
24. Zhang C., Mortuza S.M., He B., Wang Y., Zhang Y. (2018) «Template-based and free modeling of I-TASSER and QUARK pipelines using predicted contact maps in CASP12», *Proteins*, 86(Suppl. 1), pp 136–151. doi: [10.1002/prot.25414](https://doi.org/10.1002/prot.25414).
25. Zhao H., Waite J.H. (2006) «Linking adhesive and structural proteins in the attachment plaque of *Mytilus californianus*», *J. Biol. Chem.*, 281(36), pp 26150–26158. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M604357200>.