

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



**ШАПОШНИКОВ**  
Леонид Александрович

**КЛОНИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-  
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК  
РИБОНУКЛЕОЗИДГИДРОЛАЗЫ С (RINC) ИЗ  
БАКТЕРИЙ *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI* LR1**

1.5.4. Биохимия  
1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

**Научные руководители:**

профессор, доктор химических наук,  
**Тишков Владимир Иванович**

доктор химических наук,  
**Пометун Анастасия Александровна**

**Официальные оппоненты:**

**Демидюк Илья Валерьевич**

доктор химических наук, профессор Российской академии наук, доцент, начальник лаборатории функциональной энзимологии Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

**Рубцова Мария Петровна**

профессор, доктор химических наук, профессор Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Жданов Дмитрий Дмитриевич**

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией медицинской биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Защита диссертационной работы состоится **«14» мая 2024 года в 15 часов** на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11Б, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2650>

Автореферат разослан «09» \_\_\_\_\_ апреля \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

И.К. Сакодынская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Внутрибольничные инфекции в настоящее время являются актуальной и серьёзной проблемой. Одними из возбудителей этих инфекций традиционно считаются бактерии рода *Klebsiella*. Эти патогены вызывают пневмонию, сепсис, воспаление мочеиспускательной системы, проблемы с печенью и почками, а их резистентность к антибиотикам с каждым годом возрастает. Известно, что при обработке антибактериальными агентами эти бактерии переходят в состояние биоплёнки, в котором их устойчивость значительно повышается. Особо остро проблема биоплёнок клебсиелл стоит в области трансплантологии суставов. В среднем каждая 25-30-я операция сопровождается сепсисом, вызванным стафилококком или клебсиеллой, которые в этом случае в организме существуют именно в виде биопленок. Поэтому поиск способов борьбы с такими биоплёнками является актуальным на настоящий момент.

При проведении совместного культивирования бактерий рода *Lactobacillus* и бактерий рода *Klebsiella* оказалось, что существует два штамма лактобактерий - *Limosilactobacillus reuteri* LR1 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* F, которые проявляют антагонистическое действие к бактериям *Klebsiella*. Эти штаммы особо интересны потому, что они входят в состав собственной микробиоты кишечника человека, а значит, белки, которые они синтезируют, с высокой долей вероятности не будут вызывать иммунный ответ. Был проведён протеомный анализ как свободных *L. reuteri* и *L. rhamnosus*, так и при их совместном культивировании с бактериями рода *Klebsiella*, и оказалось, что в ответ на действие патогена лактобактерии синтезируют ряд белков, способствующих подавлению роста клебсиелл. Анализ с помощью тандемной MALDI/TOF/TOF спектрометрии показал, что среди этих белков есть гидролазы, способствующие разрушению пептидных сшивок в пептидогликане клебсиелл или углеводного остова этого пептидогликана, белки, гидролизующие нуклеиновые кислоты, а также белки метаболизма, которые синтезируются только в ответ на присутствие клебсиелл. Одним из таких ферментов является рибонуклеозидгидролаза C (RihC) из *L. reuteri*.

RihC катализирует реакцию расщепления рибонуклеозидов до азотистых оснований и рибозы. Этот фермент относится к семейству рибонуклеозидгидролаз, включающему в себя ряд ферментов: IG-NH (inosine-guanosine-preferring nucleoside hydrolase), IAG-NH (inosine-adenosine-guanosine-preferring nucleoside hydrolase), RihA (ribonucleoside hydrolase A), RihB (ribonucleoside hydrolase B) и RihC. IG-NH и IAG-NH являются пурин-специфическими гидролазами, RihA и RihB являются пиримидин-специфическими гидролазами, тогда как RihC катализирует реакции как с пиримидинами, так и с пуринами. Не до конца ясна физиологическая роль данного фермента в лактобактериях и то, почему он синтезируется именно в ответ на присутствие патогенов.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы является клонирование фермента RihC из бактерий *L. reuteri* LR1 и изучение его структурно-функциональных характеристик.

Задачи исследования:

- Получение рекомбинантного фермента RihC из *L. reuteri*,
- Разработка методики определения ферментативной активности RihC с помощью гидрофильной хроматографии,
- Изучение основных свойств фермента,
- Получение кристаллов RihC и изучение пространственной структуры данного фермента,

- Изучение потенциальной антибактериальной активности RihC из *L. reuteri* на патогенных организмах группы ESKAPE и *E. coli*.

**Научная новизна.** В ходе выполнения данной работы впервые получен фермент RihC из бактерий *L. reuteri*. Разработана новая быстрая удобная методика определения ферментативной активности данного фермента, которая также может подойти и для изучения ферментативной активности любого фермента семейства нуклеозидгидролаз Rih. Изучена ферментативная активность данного фермента с различными субстратами и получены кинетические параметры. Изучена термостабильность фермента. Впервые получены кристаллы данного фермента, решена пространственная структура и определена её взаимосвязь с катализом. Изучена антибактериальная активность этого фермента как собственная, так и в комплексе с известными антибиотиками, а также его влияние на эффективность образования биоплёнок.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты, полученные в данной работе, имеют как фундаментальное, так и прикладное значения. В настоящий момент в мире есть несколько направлений применения рибонуклеозидгидролаз семейства Rih: разработка средств борьбы с простейшими паразитами, разработка вакцин животных против простейших паразитов, разработка антиопухолевых препаратов на основе этих ферментов. Данный фермент может использоваться для достижения любой из этих практических задач. Более того, ещё одним потенциальным направлением для практического применения данного фермента является изучение его антибактериальной активности против патогенных организмов и разработка лекарственного средства на его основе при успешных результатах исследований, поскольку данный фермент является одним из ключевых белков, выделяющихся в ответ на присутствие клебсиелл. Помимо этого, разработанная методика определения ферментативной активности может использоваться не только для фермента, описанного в работе, но и для всего семейства ферментов Rih.

**Методология и методы исследования.** В рамках данной работы были использованы следующие методы и подходы: методы биоинформатики (поиск последовательностей генов и ферментов по базам данных, построение множественных выравниваний, построение филогенетического дерева, конструирование последовательностей праймеров, моделирование пространственных структур белков); методы генетической инженерии (полимеразная цепная реакция, методы работы с нуклеиновыми кислотами); методы молекулярной биологии (экспрессия штаммов-продуцентов рекомбинантных ферментов, трансформация); хроматографические методы (металл-хелатная хроматография, гель-фильтрация, гидрофильная хроматография); физико-химические методы анализа белковых молекул (спектрофотометрия, масс-спектрометрия, дифференциальная сканирующая калориметрия), методы структурной биологии (кристаллизация белковых молекул, анализ структуры белковых молекул).

**Личный вклад автора.** Все научные результаты, изложенные в диссертации, получены при личном участии Шапошникова Леонида Александровича под руководством д.х.н. Пометун Анастасии Александровны и проф., д.х.н. Тишкова Владимира Ивановича. Все эксперименты по изучению антибактериальной активности проводились при сотрудничестве с учёными Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России), Санкт-Петербург, Россия на базе их учреждения. Автор самостоятельно изучил современные литературные данные по

теме исследования и на их основании составил обзор литературы. Соискатель самостоятельно определил цели и задачи, составил план работы, проводил исследования и анализировал полученные результаты. Автором была проведена значительная работа над текстом опубликованных статей, а также представление их в редакции журналов. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1) Клонированные последовательности соответствуют гену RihC из бактерий *Limosilactobacillus reuteri* LR1, при этом у клонированных последовательностей подтверждено наличие His-tag на N- или C-конце. Уровень экспрессии для фермента с His-tag на N-конце в клетках *E. coli* примерно в 3 раза больше, чем для фермента с His-tag на C-конце.

2) Разработанный подход определения ферментативной активности RihC и, соответственно, кинетических параметров этого фермента в настоящий момент является самым экспрессным и эффективным и подходит для изучения ферментативной активности любых ферментов семейства Rih.

3) Фермент RihC из *L. reuteri* к настоящему моменту имеет лучшие каталитические константы даже для наименее предпочтительных субстратов по сравнению с ферментами RihC из других организмов, причём для фермента с His-tag на N-конце каталитические константы выше, чем для фермента с His-tag на C-конце. Константы Михаэлиса не зависят от положения His-tag и согласуются с константами Михаэлиса ферментов RihC из других источников. Фермент RihC из *L. reuteri* является стабильным при повышенных температурах, инактивируется необратимо со значимой скоростью инактивации только при температурах, близких к 60°C.

4) Фермент кристаллизуется в виде тетрамера и содержит один ион кальция в каждой субъединице и два иона кальция в межсубъединичных контактах. Ион кальция в активном центре важен для катализа, при удалении кальция ферментативная реакция не происходит. За стабилизацию иона кальция и кольца рибозы субстрата в активном центре отвечает несколько остатков аспарагиновой кислоты и аспарагина. За стабилизацию азотистого основания субстрата отвечают остатки гистидина и тирозина. Высокие значения каталитических констант по всем субстратам, вероятно, обуславливаются большей подвижностью полипептидной цепи белка в районе центра связывания азотистого основания субстрата.

5) Фермент снижает эффективность образования биоплёнок некоторых патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, в том числе *K. pneumoniae*, и обладает синергизмом с меропенемом против *K. pneumoniae* и *E. coli*.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность данных экспериментов обеспечена использованием современных методов исследования, проведением ряда независимых экспериментов с использованием положительных и отрицательных контролей. Все эксперименты проводили на сертифицированном оборудовании в трех и более независимых повторах, для анализа данных использовали современные методы статистической обработки. Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях: International Conference "Biocatalysis-2023: Fundamentals and Applications", (Суздаль, Россия, 2023), XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов – (Москва, Россия, 2021)".

**Публикации.** По материалам работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами Web of Science и Scopus, 3 тезиса докладов конференций (из них 1 публикация в журнале из списка Web of Science и Scopus).

**Связь работы с государственными программами.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ), грант № 23-64-10029.

**Структура и объём работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 117 страницах и содержит 36 рисунков, 12 таблиц и 216 ссылок.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

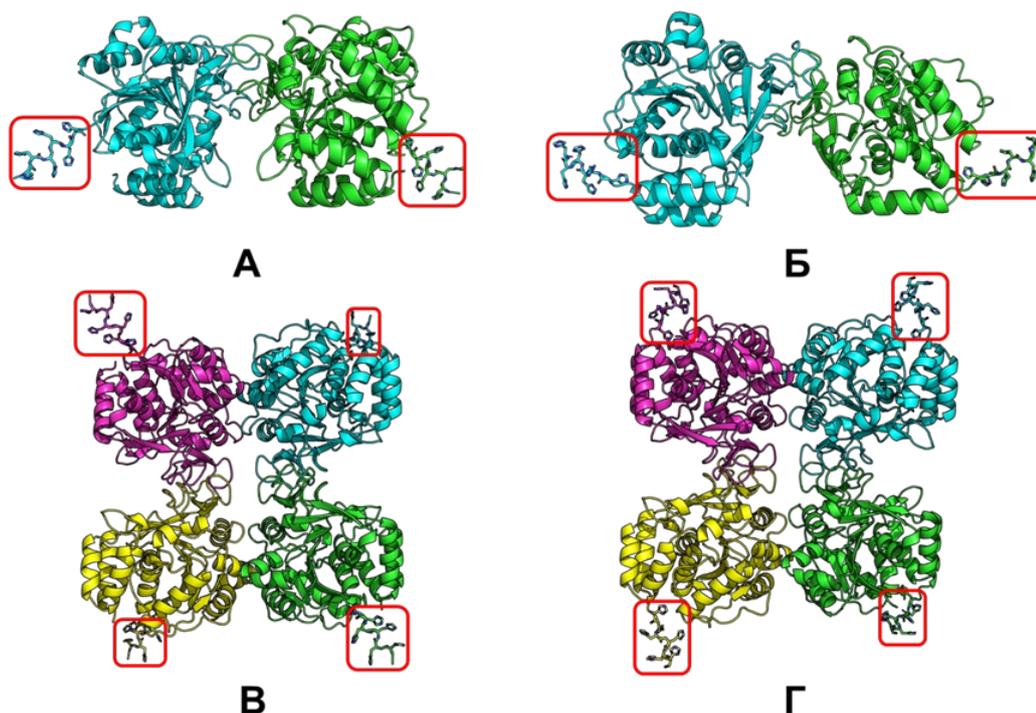
### Выбор фермента для клонирования

Рибонуклеозидгидролаза С (RihC) катализирует реакцию расщепления рибонуклеозидов до азотистых оснований и рибозы. Физиологическая роль этого фермента для бактерий *L. reuteri* не ясна, однако было показано, что он синтезируется в данных бактериях именно в ответ на присутствие бактерий *Klebsiella*. Клонирование и изучение нового белка является важной фундаментальной задачей для науки, однако в данном случае, в дополнение к теоретической важности, понимание физиологической роли фермента могло бы помочь понять механизм ответа лактобактерий на патогены.

В данной работе было решено клонировать фермент RihC с добавлением последовательности, кодирующей шесть остатков гистидина (His-tag), на N- или C-конец фермента. В целом добавление His-tag позволяет значительно упростить и ускорить процесс очистки белков. Однако добавление His-tag может тем или иным образом влиять на экспрессию фермента или на его свойства, причём нет строгих закономерностей, и для каждого белка это влияние (или отсутствие влияния) может проявляться по-своему. Именно поэтому в данной работе было решено получить обе формы фермента, чтобы изучить влияние положения His-tag на его свойства.

### Моделирование структуры LreRihC

Структурное моделирование проводили с помощью бесплатной версии инструмента AlphaFold2 на базе Google Collab. К настоящему времени получен ряд кристаллических структур для ферментов из семейства Rih, в т.ч. 7 структур для RihC из различных источников (2 бактериальных фермента, 2 растительных и 3 из простейших), при этом эти структуры представляют собой гомодимеры или гомотетрамеры, а строгой корреляции между степенью олигомеризации и источником фермента нет. В связи с этим было проведено моделирование LreRihC с добавлением His-tag на N- или C-конец в виде гомодимера и гомотетрамера. Результаты моделирования представлены на рисунке 1.



**Рис.1.** Модели димеров RihC\_HisN (А) и RihC\_HisC (Б) и тетрамеров RihC\_HisN (В) и RihC\_HisC (Г), построенные с помощью AlphaFold2. His-tag каждой субъединицы обведён красным

Из этого рисунка видно, что гистидиновые метки на N- и С-конце фермента направлены наружу от белковой глобулы и не должны препятствовать ферментативному катализу, при этом эффективно связываясь с носителем колонки для металл-хелатной хроматографии. Однако также можно заметить, что у тетрамера RihC\_HisN His-tag направлен полностью наружу каждой белковой глобулы, а у тетрамера RihC\_HisC His-tag может частично закрывать вход в активный центр, ухудшая катализ. Тем не менее, поскольку при моделировании даже в случае высокой степени соответствия аминокислотной последовательности реальным структурам N- и С-концы имеют более низкий процент совпадения и обычно их положение в пространстве предсказывается менее точно, нельзя однозначно сказать, что His-tag на С-конце будет строго негативно влиять на свойства LreRihC, поэтому было решено получить два варианта фермента LreRihC (с His-tag на N- и на С-конце) и сравнить их свойства.

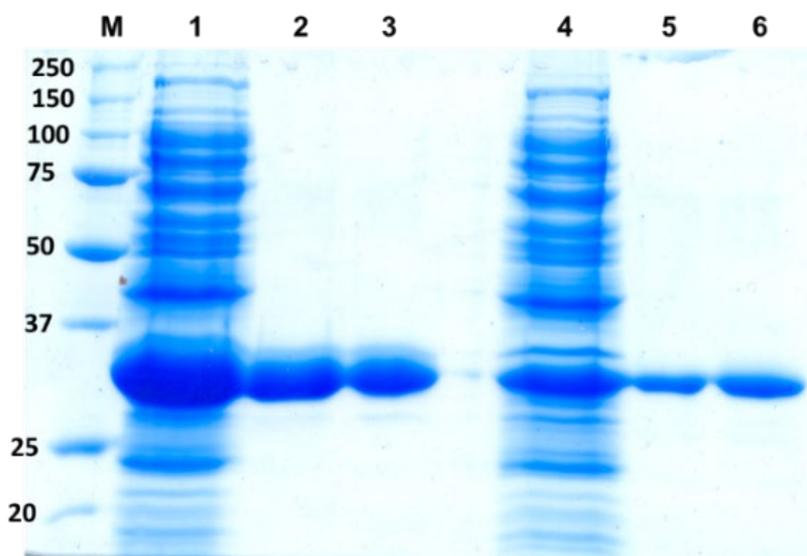
#### **Получение фермента LreRihC с His-tag**

Генетические конструкции, содержащие ген RihC с His-tag на N- или С-конце, были получены с помощью ПЦР с геномной ДНК бактерий *Limosilactobacillus reuteri* LR1 (штамм был любезно предоставлен Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»)), рестрикции полученных фрагментов и вектора pET-24a(+) и последующего лигирования. Результаты секвенирования показали, что генетические конструкции содержат только ген RihC с целевой вставкой (His-tag на N- или С-конце фермента). Размер каждого из генов RihC с His-tag на том или ином конце составил 927 п.н., каждый из генов кодирует белок длиной 308 аминокислотных остатка и размером 33,38 кДа, номер в банке данных фермента RihC из *L. reuteri* без His-tag MBU5982057.1.

В результате экспрессии было показано, что оба фермента с His-tag экспрессируются в клетках *E. coli* в растворимой форме, причём выход составил примерно

180 мг с литра питательной среды для RihC\_HisN и примерно 60 мг с литра питательной среды для RihC\_HisC, т.е. положение His-tag оказало влияние на уровень экспрессии данного белка. Мы предполагаем, что фолдинг RihC\_HisN после синтеза в клетке проходит более эффективно, за счёт чего этого белка в активной и растворимой форме получается больше.

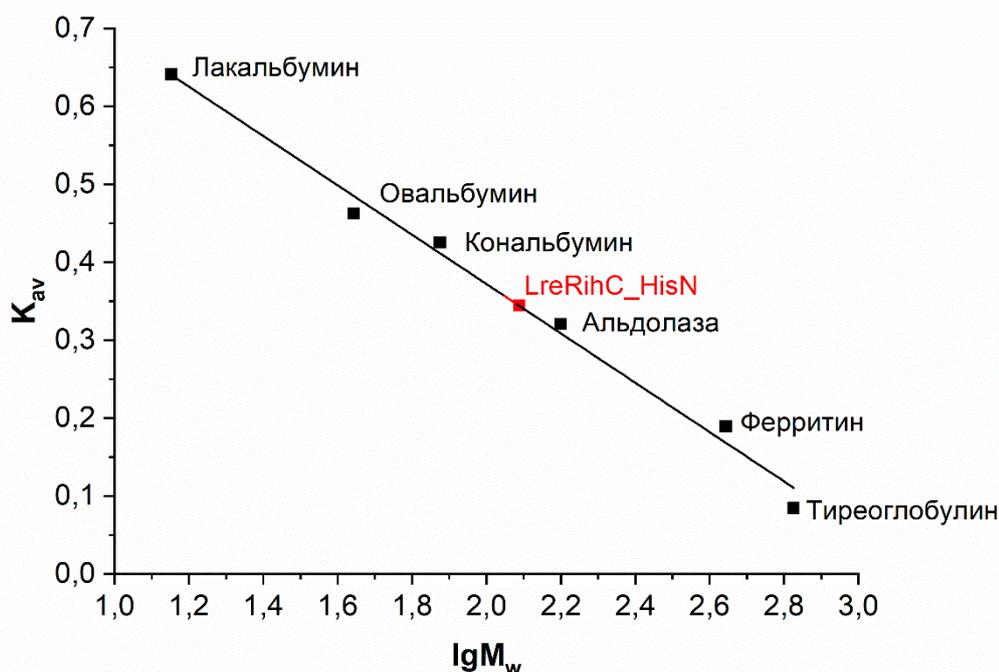
Выделение и очистку фермента проводили согласно разработанным ранее в лаборатории методикам. Степень чистоты подтверждали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях, результаты представлены на рисунке 2, а также с помощью тандемной MALDI-TOF масс-спектрологии. Процент совпадения RihC после анализа MALDI с теоретической последовательностью составил 98% для обеих форм. Из рисунка 2 видно, что оба фермента в результате очистки получились в высокоочищенном состоянии со степенью чистоты не менее 95%. Также видна разница в уровнях экспрессии для этих двух форм фермента. Теоретическая масса мономера LreRihC с добавлением His-tag на любой конец составляет 33,4 кДа, что также согласуется с полученными результатами SDS-PAGE для обеих форм белка.



**Рис.2.** ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях для RihC\_HisN и RihC\_HisC. М - маркеры молекулярной массы, 1 - бесклеточный экстракт RihC\_HisN после обработки УЗ, 2 - препарат RihC\_HisN после проведения металл-хелатной хроматографии, 3 - препарат RihC\_HisN после проведения гель-проникающей хроматографии, 4 - бесклеточный экстракт RihC\_HisC после обработки УЗ, 5 - препарат RihC\_HisC после проведения металл-хелатной хроматографии, 6 - препарат RihC\_HisC после проведения гель-проникающей хроматографии

### **Определение олигомерного состава фермента**

Олигомерный состав RihC определяли с помощью аналитической гель-фильтрации. Калибровочная кривая с нанесённым на неё RihC\_HisN представлена на рисунке 3. Для RihC\_HisC в ходе данной работы были получены идентичные результаты, положение на графике накладывается на положение RihC\_HisN.



**Рис.3.** Градуировочная кривая аналитической гель-фильтрации. Красным отмечен целевой фермент RihC\_HisN

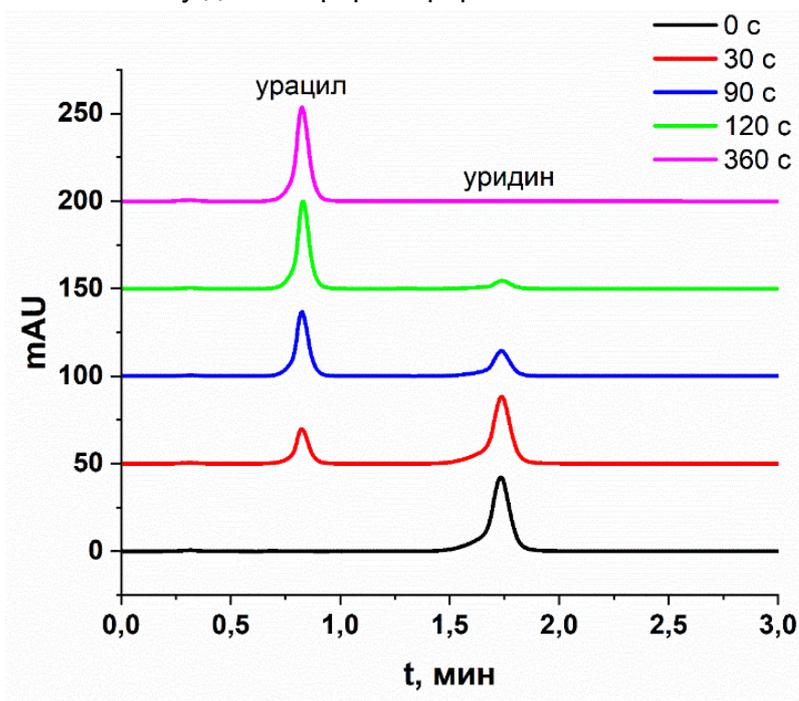
Теоретическая масса мономера RihC\_HisN и RihC\_HisC, рассчитанная с помощью аминокислотной последовательности, составляет 33,4 кДа. Молекулярная масса образцов RihC\_HisN и RihC\_HisC при гель-фильтрации составила 121 и 123 кДа соответственно, что соответствует тетрамеру. Ранее показали, что RihC из *E. coli* в растворе находится в виде димера. При этом нуклеозидгидролаза из *C. fasciculata* является тетрамером, а фермент из *Trypanosoma brucei brucei* является димером, как и в случае *E. coli*. В целом, нет какой-либо строгой зависимости между источником нуклеозидгидролазы и её олигомерным состоянием в растворе. В случае гидролазы LreRihC оказалось, что она существует в виде тетрамера, при этом положение His-tag не влияет на её олигомерное состояние.

#### **Разработка методики определения активности RihC**

Для разделения нуклеозидов и азотистых оснований использовали 20 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор (pH 4,7) и ацетонитрил в качестве подвижной фазы; детектирование проводили при длине волны УФ-детектора 254 нм. С целью повышения экспрессности анализа увеличили скорость потока элюента с 0,5 мл/мин до 1 мл/мин, а также варьировали долю водной фазы в элюенте в диапазоне 5–10%.

Оптимальными условиями элюирования с точки зрения полного разрешения пиков и экспрессности разделения нуклеозидов и азотистых оснований были выбраны 90% ацетонитрила и 10% ацетатного буфера. В соответствии с этим, вносимые пробы должны содержать 10% водного раствора аналита и 90% ацетонитрила, что и было учтено при подготовке проб для анализа. Для проведения одного анализа в систему вкалывали 20 мкл исследуемого образца, анализ проводили в течение 2 минут. На рисунке 4 в качестве примера представлены результаты серии из пяти анализов (по мере увеличения времени ферментативной реакции) с ферментом RihC с His-tag на C-конце. Из этого рисунка видно, что времена удерживания и уридина, и урацила постоянны и являются небольшими (0,9 мин для урацила и 1,7 мин для уридина) в сравнении с коммерчески доступными колонками (лучшее время выхода уридина на данный момент в таких колонках составляет около 3

минут против 1,7 минут у данной колонки), а также что количество урацила по мере увеличения времени ферментативной реакции возрастает, что подтверждает наличие ферментативной активности у данной формы фермента RihC.



**Рис.4.** Серия хроматограмм после проведения ферментативной реакции с RihC с His-tag на С-конце. Разные цвета кривых соответствуют разным временам ферментативной реакции. Исходная концентрация уридина составляла 0,5 мМ.

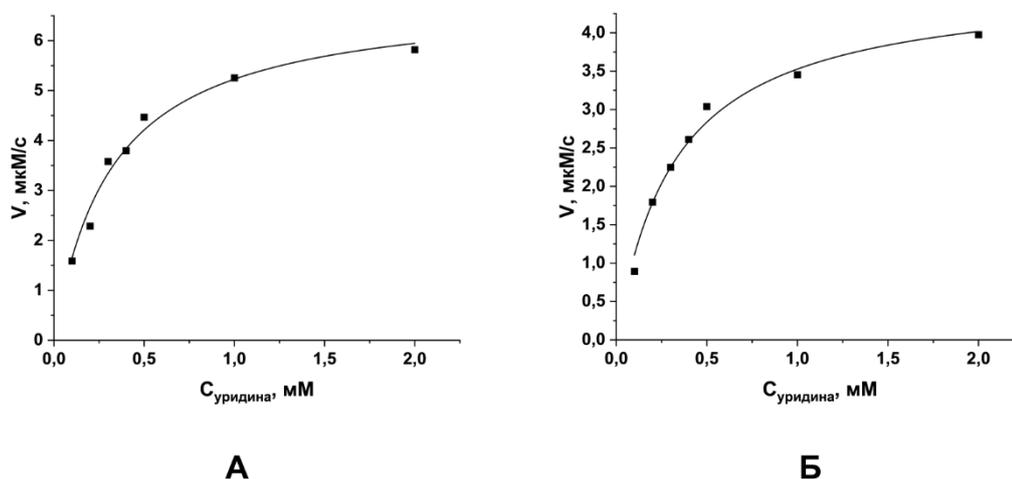
Важно отметить, что сорбенты такой структуры также демонстрируют высокую эффективность и селективность при разделении модельных смесей различных полярных соединений в гидрофильном режиме. Так, эффективность по уридину на фазе, используемой в работе, достигает 30000 тт/м, что больше, чем для многих коммерчески доступных колонок. Более того, поскольку RihC катализирует реакции превращения рибонуклеозидов в азотистые основания, то данный метод определения ферментативной активности можно использовать не только для конкретного фермента RihC, полученного в ходе данной работы, но и для фермента RihC из любого другого источника и даже для других ферментов из семейства Rih, т.е. метод является универсальным.

Для дальнейших расчётов кинетических параметров, представленных в следующем разделе, каждое значение скорости было рассчитано из пяти усреднённых зависимостей концентрации азотистого основания (продукта) от времени протекания ферментативной реакции, времена реакции варьировали для разных субстратов. При этом концентрации каждого азотистого основания рассчитывали из усреднённых площадей пиков этого азотистого основания с помощью градуировочной зависимости, полученной для каждого азотистого основания. Для определения одной скорости реакции при определённой концентрации субстрата было проведено 15 анализов. Всего для построения одной зависимости скорости реакции от концентрации субстрата было проведено 225 анализов плюс дополнительно 15 анализов для построения градуировочной зависимости. Для построения одной упомянутой зависимости скорости реакции было затрачено 480 минут или 8 часов непрерывных анализов. При этом при использовании методики изучения ферментативной активности RihC из *E.coli*, описанной в литературе, при идентичном количестве анализов время составило бы 2400 минут или 40 часов, а при использовании

лучшей коммерчески доступной колонки в режиме ГИХ время составило бы 720 минут или 12 часов непрерывных анализов. Это указывает на большое преимущество разработанной методики для изучения активности фермента LreRihC в данной работе.

### Кинетические параметры LreRihC

В качестве субстратов были выбраны четыре основных рибонуклеозида: уридин, цитидин, гуанозин, аденозин, а также инозин, ксантозин, 5-метилуридин, тимидин, 2'-дезоксирибоуридин и видарабин. Ферментативные реакции проводили в буфере 0,05 M Tris-HCl pH 7,5 при 37°C, конечная концентрация фермента составляла 2 мкг/мл, времена реакции варьировали для разных субстратов, останавливали реакцию добавлением  $\text{HCl}_{\text{конц}}$ . Для каждого основного рибонуклеозида, кроме гуанозина, а также для инозина и ксантозина была получена зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Кинетические параметры, полученные из анализа этих зависимостей, представлены в таблице 1. В этой таблице также представлены кинетические параметры других рибонуклеозидгидролаз. В качестве примера, на рисунке 5 представлены зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации уридина в диапазоне измерения  $K_M$  для ферментов RihC\_HisN (А) и RihC\_HisC (Б). Для других субстратов зависимости выглядят аналогично. Гуанозин и гуанин имеют низкую растворимость в условиях протекания реакции, поэтому для данного рибонуклеозида удалось только измерить активность фермента при максимальной концентрации субстрата 2 мМ. Реакции расщепления тимидина и 2'-дезоксирибоуридина не наблюдались при любых концентрациях этих субстратов, из чего можно сделать вывод, что фермент LreRihC действительно катализирует реакции расщепления исключительно рибонуклеозидов. Более того, поскольку фермент проявил активность как с пуриновыми, так и с пиримидиновыми рибонуклеозидами, этот фермент действительно относится к классу RihC, т.е. неспецифичных нуклеозидгидролаз.

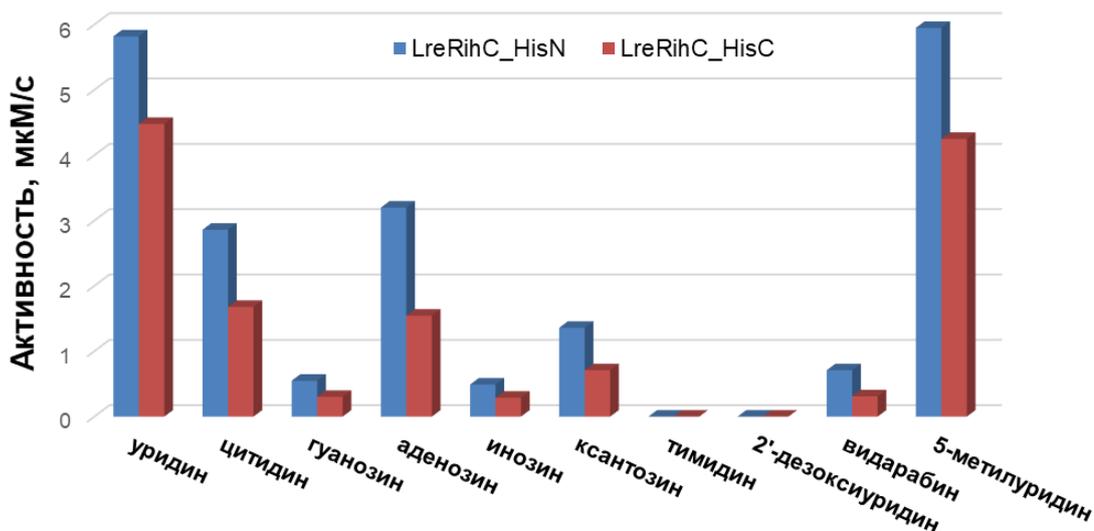


**Рис.5.** Зависимость скорости ферментативной реакции RihC\_HisN (А) и RihC\_HisC (Б) от концентрации уридина в диапазоне концентраций  $0,5K_M$ – $5K_M$

Для всех изученных субстратов для обеих форм фермента LreRihC при небольших концентрациях субстрата наблюдается классическая зависимость Михаэлиса-Ментен. Из данных таблицы 1 видно, что в пределах погрешности положение His-tag не влияет на константы Михаэлиса фермента LreRihC со всеми субстратами, однако влияет на величину константы скорости реакции  $k_{cat}$ , причём для каждого из субстратов наблюдается, что  $k_{cat}$  RihC\_HisN выше, чем  $k_{cat}$  для RihC\_HisC. Наименьшей  $K_M$  и наибольшей  $k_{cat}$  обладает

реакция расщепления уридина для обеих форм данного фермента, что свидетельствует о наибольшей эффективности работы фермента с данным субстратом. Измерить кинетические параметры для реакции с гуанозином не удалось ввиду низкой растворимости данного субстрата в условиях работы фермента. При сравнении кинетических параметров ферментов LreRihC, полученных в данной работе, с ферментами из других источников можно отметить, что константы Михаэлиса сравнимы с константами фермента из *E. coli* и составляют порядка нескольких сот мкМ, однако каталитические константы даже для наименее предпочтительных LreRihC субстратов являются высокими по сравнению со всеми другими ферментами RihC и сравнимыми только с  $k_{cat}$  по наиболее предпочтительным субстратам для некоторых RihC (например, для CfaRihC).

Для того, чтобы понимать относительную эффективность расщепления данным ферментом гуанозина, было проведено сравнение активности фермента с разными субстратами при одинаковых концентрациях (была выбрана концентрация 2 мМ как максимально достижимая концентрация гуанозина в рабочем растворе). Помимо этого, была изучена активность фермента по отношению к другим нуклеозидам: двум 2'-дезоксирибонуклеозидам (тимидин и 2'-дезоксисуридин), одному рибонуклеозиду (5-метилуридин; он же риботимидин) и одному арабинозиду (видарабин, аналог аденозина). Результаты представлены на рисунке 6.



**Рис.6.** Активность двух форм LreRihC с 2 мМ соответствующего субстрата

Из представленных данных видно, что со всеми основными рибонуклеозидами обе формы фермента проявляют каталитическую активность, причём наибольшая активность наблюдается в отношении уридина, а наименьшая – в отношении гуанозина. С 2'-дезоксирибонуклеозидами реакция не идёт, что подтверждает важную роль 2'-ОН группы рибонуклеозида в катализе, поскольку данная группа координируется ионом кальция в активном центре фермента, таким образом правильно ориентируя субстрат для катализа. Из этого же рисунка видно, что активность RihC\_HisC ниже активности RihC\_HisN для каждого изученного субстрата, что напрямую связано с кинетическими свойствами этих двух форм.

**Таблица 1** Кинетические параметры ферментов RihC в реакции с разными субстратами

Фермент	$K_{cat}^{\text{уридин}}$ , с <sup>-1</sup>	$K_M^{\text{уридин}}$ , мкМ	$K_{cat}^{\text{цитидин}}$ , с <sup>-1</sup>	$K_M^{\text{цитидин}}$ , мкМ	$K_{cat}^{\text{инозин}}$ , с <sup>-1</sup>	$K_M^{\text{инозин}}$ , мкМ	$K_{cat}^{\text{ксантозин}}$ , с <sup>-1</sup>	$K_M^{\text{ксантозин}}$ , мкМ	$K_{cat}^{\text{аденозин}}$ , с <sup>-1</sup>	$K_M^{\text{аденозин}}$ , мкМ	$K_{cat}^{\text{гуанозин}}$ , с <sup>-1</sup>	$K_M^{\text{гуанозин}}$ , мкМ	Работа
<b>LreRihC HisN</b>	<b>167±6</b>	<b>320±40</b>	<b>112±4</b>	<b>680±80</b>	<b>30±5</b>	<b>2500±600</b>	<b>57±8</b>	<b>1200±200</b>	<b>118±4</b>	<b>420±50</b>	нд	нд	<b>Настоящая работа</b>
<b>LreRihC HisC</b>	<b>134±6</b>	<b>320±40</b>	<b>58±6</b>	<b>620±60</b>	<b>18±6</b>	<b>2600±600</b>	<b>40±6</b>	<b>1300±200</b>	<b>65±7</b>	<b>480±90</b>	нд	нд	<b>Настоящая работа</b>
EcoRihC*	10,85±0,23	408±184	1,12±0,53	682±298	4,31±0,22	422±225	6,30±0,05	454±165	1,15±0,47	416±249	нд	нд	[1]
CfaRihC	143	1220±40	20	4700±500	32	380±30	нд	нд	4,3	460±30	2	420±10	[2,3]
SenRihC	46±3**	1060±100**	7,8±1,3**	9200±1200**	9,0±0,15** 8,1±0,14***	650±60** 1280±130***	62±8** 26,3±0,3***	5900±1000** 790±50***	2,06±0,07**	160±20**	нд	нд	[4]
LmaRihC	32±6	234±112	0,36±0,05	422±175	119±34	445±209	нд	нд	0,57±0,04	185±46	0,59±0,03	140±23	[3]

нд – нет данных

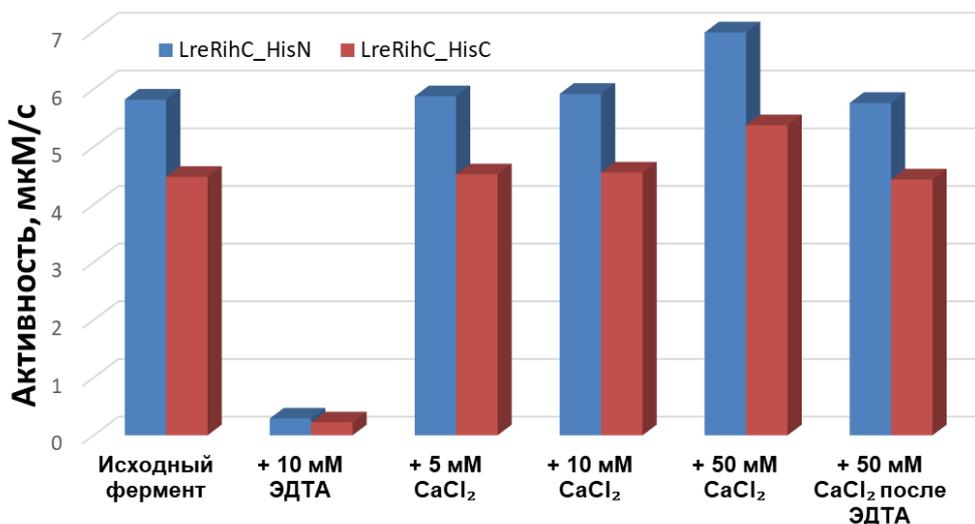
\* - каталитические константы для фермента из *E. coli* приведены авторами в расчёте на одну субъединицу;

\*\* - данные для pH 7,2;

\*\*\* - данные для pH 6,0

1. Arivett B. et al. Characterization of inosine-uridine nucleoside hydrolase (RihC) from *Escherichia coli* // *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* Elsevier B.V., 2014. Vol. 1844, № 3. P. 656–662.
2. Parkin D.W. et al. Nucleoside Hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Metabolic Role, Purification, Specificity, and Kinetic Mechanism // *J Biol Chem.* 1991. Vol. 266, № 31. P. 20658–20665.
3. Shi W., Schramm V.L., Almo S.C. Nucleoside hydrolase from *Leishmania major*. Cloning, expression, catalytic properties, transition state inhibitors, and the 2.5-Å crystal structure // *Journal of Biological Chemistry.* 1999. Vol. 274, № 30. P. 21114–21120.
4. Hansen M.R., Dandanell G. Purification and characterization of RihC, a xanthosine-inosine-uridine- adenosine-preferring hydrolase from *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* // *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2005. Vol. 1723, № 1–3. P. 55–62.

Для подтверждения роли кальция в катализе данным ферментом была измерена активность расщепления уридина ферментами в присутствии 10 мМ ЭДТА, а также 5, 10 или 50 мМ CaCl<sub>2</sub>. Указанные вещества были добавлены в пробы фермента, которые затем инкубировали сутки при 4°C и ставили ферментативную реакцию с уридином (рисунок 7).



**Рис.7.** Активность двух форм LreRihC с 2 мМ уридина после инкубации фермента с ионами кальция или ЭДТА в различных концентрациях

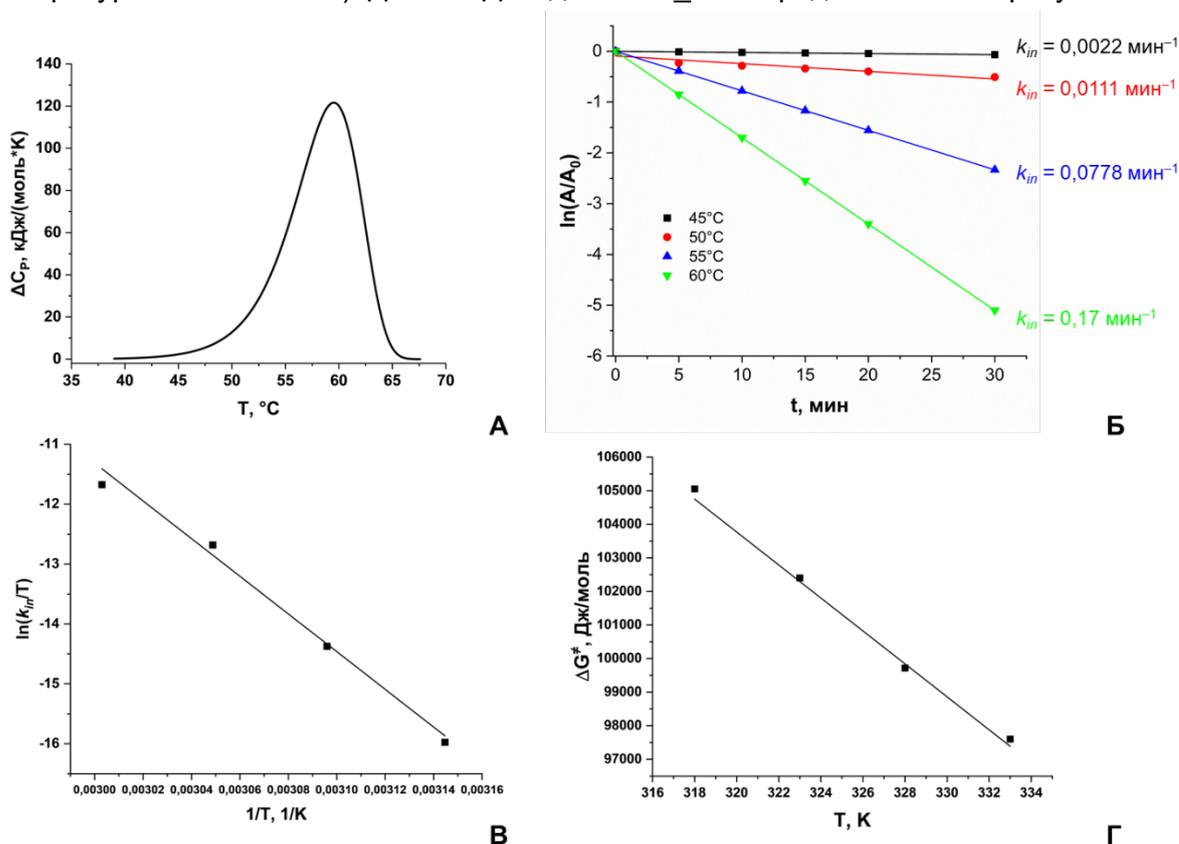
Эксперимент показал, что активность ферментов в присутствии ЭДТА упала почти в 20 раз, а при добавлении ионов кальция активность, напротив, возросла, хотя и всего на 20% для пробы с 50 мМ CaCl<sub>2</sub> по сравнению с пробой без добавленного кальция. При последующем добавлении в пробу фермента, содержащую ЭДТА, ионов кальция (концентрация 50 мМ в конечном растворе) и инкубировании активность вернулась практически на прежний уровень. Из этого можно сделать вывод, что кальций действительно является важным для катализа RihC. ЭДТА координирует и вытягивает ион кальция из активного центра фермента, из-за чего субстрат не может правильно ориентироваться для катализа и активность значительно падает. При этом активность восстанавливается при добавлении ионов кальция в такой раствор фермента. Добавление дополнительных ионов кальция практически не влияет на активность, а небольшой рост этого параметра можно объяснить тем, что при синтезе белка в клетках было такое количество доступных ионов кальция, что небольшое количество белковых глобул свернулось без него. Добавление раствора кальция позволяет этим некоторым белковым молекулам тоже вступить в катализ, за счёт чего активность повышается.

Поскольку лучшими кинетическими свойствами, а также лучшей экспрессией обладает фермент с His-tag на N-конце, дальнейшие исследования проводили именно для этого фермента.

### Температурная стабильность LreRihC

Для исследования температурной стабильности LreRihC использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). В ходе эксперимента линейно повышали температуру исследуемого образца и эталона и смотрели за изменением теплоёмкости. Поскольку денатурация белка является фазовым переходом, на экспериментальной кривой наблюдается повышение изменения теплопроводности образца с пиком при температуре, при которой наблюдается максимальная скорость

денатурации и которая является характеристикой термостабильности белков (т.н. температура плавления  $T_m$ ). Данные ДСК для RihC\_HisN представлены на рисунке 8 А.



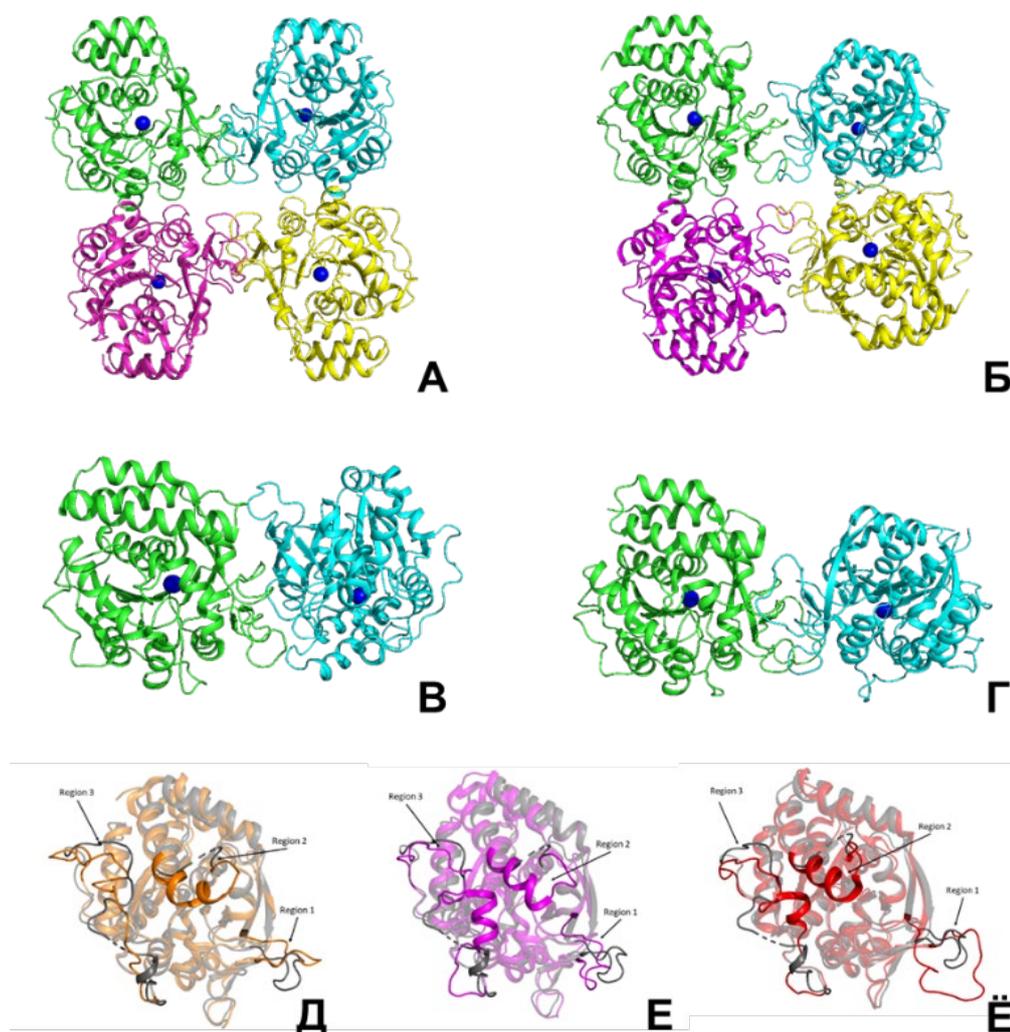
**Рис.8.** (А) Кривая ДСК для RihC\_HisN, (Б) зависимость остаточной активности LreRihC\_HisN от времени инкубирования при разных температурах в реакции с 30 мМ уридином, (В) график расчёта параметра  $\Delta H^\ddagger$  термоинактивации фермента, (Г) график расчёта параметра  $\Delta S^\ddagger$  термоинактивации фермента

Из рисунка видно, что  $T_m$  для данного фермента составляет  $59,5^\circ\text{C}$ . Эта кривая ДСК аппроксимируется одним калориметрическим доменом. Белок инактивируется необратимо.

Также была изучена кинетика термоинактивации RihC\_HisN при разных температурах. В качестве температурного диапазона были выбраны 45, 50, 55 и  $60^\circ\text{C}$ , основываясь на данных ДСК. Зависимости остаточной активности фермента от времени инкубации представлены в полулогарифмических координатах на рисунке 8 Б. Все значения остаточной активности усреднены по трём экспериментам для каждой точки на графике. Для изучения активности использовали 30 мМ уридина. Инкубация проб фермента проводилась в 0,1M NaPB pH 7,0. При температуре  $60^\circ\text{C}$  активность фермента падает в 2 раза уже за 5 минут инкубации. В целом, все наблюдаемые зависимости линейны, что говорит о мономолекулярности процесса термоинактивации для данного фермента. Константы скорости данного процесса для каждой температуры представлены на рисунке. Из полученных данных с помощью уравнений теории активированного комплекса (ТАК) были найдены активационные параметры  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  (рисунок 8 В, Г), а также параметр  $T_{20}$  (температура, при которой активность фермента падает в 2 раза за 20 минут). Параметр  $\Delta H^\ddagger$  составил  $260 \pm 30$  кДж/моль, параметр  $\Delta S^\ddagger$  составил  $490 \pm 90$  Дж/(моль\*К), а параметр  $T_{20} = 53,7^\circ\text{C}$ .

## Общая структура и активный центр LreRihC

Поскольку изучение структуры было проведено только для фермента LreRihC\_HisN, далее для простоты используется сокращение LreRihC. Кристаллическая структура LreRihC была определена с разрешением 1,9 Å. В асимметричной кристаллической ячейке присутствует четыре почти идентичных субъединицы (RMSD между субъединицами не превышает 0,13 Å), сама ячейка соответствует пространственной группе P12<sub>1</sub>. Анализ контактов показал, что белок является тетрамером в кристалле (рисунок 9 А), что согласуется с исследованием олигомерного состояния в растворе. Структурное сравнение LreRihC с известными структурами RihC из других организмов показало, что упаковка похожа на фермент LmaRihC из простейшего, который тоже является тетрамером (рисунок 9 Б), тогда как бактериальная GvaRihC и растительная ZmaRihC являются димерами (рисунок 9 В, Г). В таблице 2 для удобства представлены все сокращённые названия RihC из различных организмов, которые используются далее.



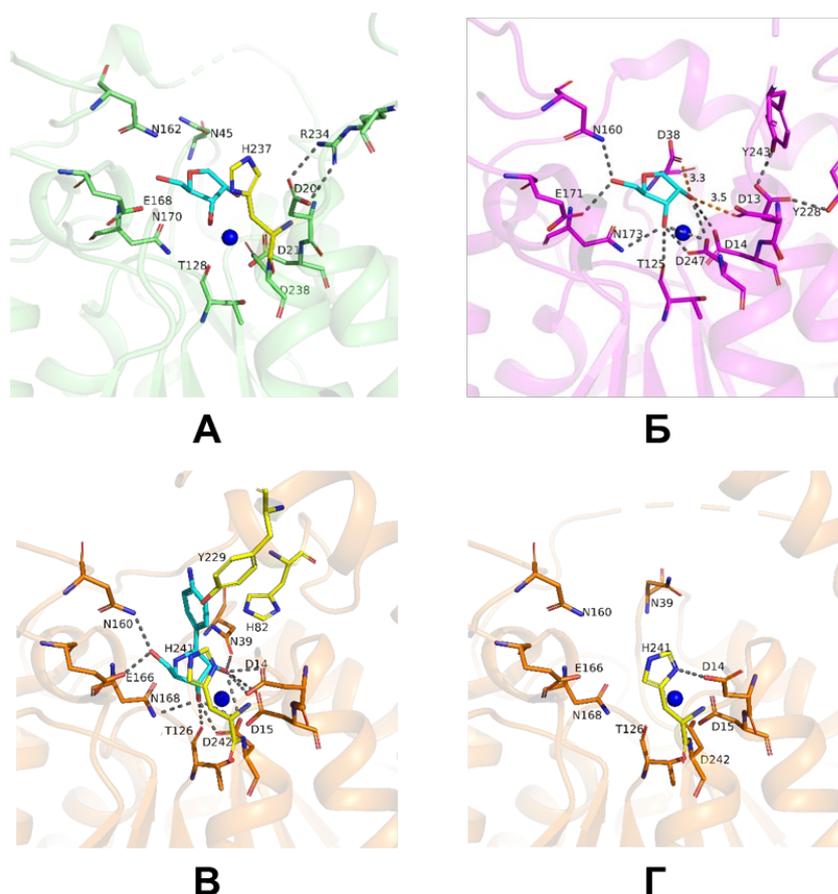
**Рис.9.** Сравнение кристаллических структур RihC. Функциональные тетрамеры LreRihC (А) и LmaRihC (Б), а также функциональные димеры GvaRihC (В) и ZmaRihC (Г). Зелёные субъединицы представлены в одинаковой ориентации. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  показаны синими сферами. Наложение субъединиц LreRihC (серая) с LmaRihC (оранжевая, Д), GvaRihC (сиреневая, Е) и ZmaRihC (красная, Ё). Хорошо наложенные регионы показаны полупрозрачными

**Таблица 2** Список сокращённых названий RihC

Тип организма	Организм	Сокращённое название гидролазы	Код PDB
Бактерии	<i>Bacillus anthracis</i>	BanRihC	2C40
Бактерии	<i>Escherichia coli</i>	EcoRihC	-
Бактерии	<i>Gardnerella vaginalis</i> 315-A	GvaRihC	6BA1
Бактерии	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> LR1	LreRihC	8QND
Бактерии	<i>Salmonella enterica</i>	SenRihC	-
Растения	<i>Zea mays</i>	ZmaRihC	4KPO
Простейшие	<i>Crithidia fasciculata</i>	CfaRihC	1MAS, 2MAS
Простейшие	<i>Leishmania major</i>	LmaRihC	1EZR

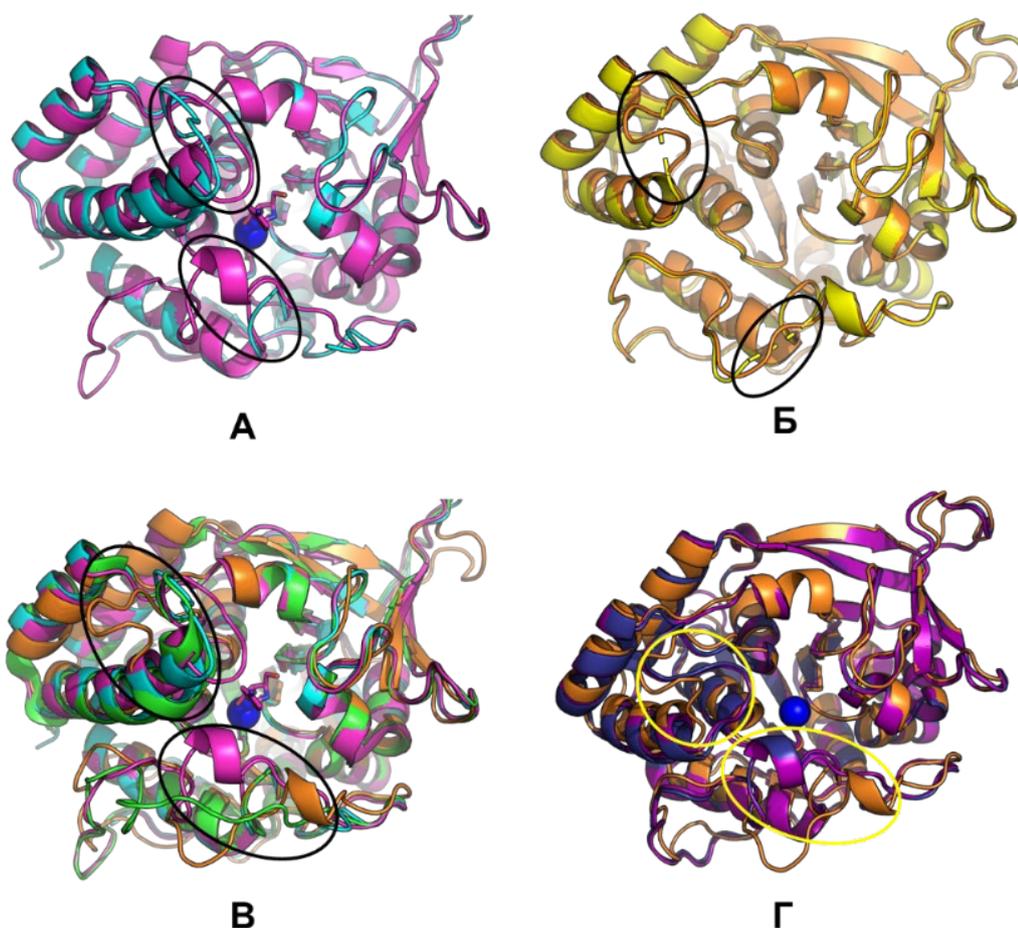
Субъединица LreRihC имеет типичную  $\alpha/\beta$  упаковку, состоящую из 11 связанных  $\beta$ -тяжей, окружённых  $\alpha$ -спиралями. Активный центр LreRihC образован остатками D16, D20, D21, N45, T128, N162, E168, N170, H237 и D238. Каждая субъединица содержит один ион  $\text{Ca}^{2+}$  в активном центре, координируемый карбоксилатами трёх консервативных остатков аспартата (D16, D21 и D238), кислородом основной цепи остатка T128 и тремя молекулами воды. Сравнение субъединиц показало, что все структуры имеют схожую укладку. Однако гидролаза LreRihC больше всего похожа на ферменты простейших LmaRihC и CfaRihC с наименьшей схожестью к бактериальным GvaRihC и BanRihC, при этом в субъединице LreRihC присутствует три участка, конформация которых наибольшим образом отличается от известных структур (рисунок 9 Д-Е).

Для описания возможного механизма связывания субстрата в LreRihC активный центр этого фермента далее сравнили с активным центром холо формы бактериальной BanRihC в комплексе с  $\alpha$ -D-рибофуранозой (рисунок 10 А, Б). Анализ наложения показал схожее окружение полости связывания рибозы, образованное остатками аспарагиновой кислоты и аспарагина. Дальнейшее сравнение структуры LreRihC с CfaRihC в холо форме показало, что в данном случае соответствующие остатки аспарагина и аспартата тоже участвуют в связывании кольца рибозы (рисунок 10 В), однако в апо форме CfaRihC (рисунок 10 Г) D14 образует солевой мостик с H241, а N39 ориентирован от активного центра, что похоже на апо форму LreRihC. В CfaRihC остатки H82, Y229 и H241 являются единственными остатками, координирующими азотистое основание субстрата. В случае LreRihC остаток H237 находится в похожей ориентации (рисунок 10 А, В), однако остатки H86 и Y226 расположены на подвижных участках 3 и 2 соответственно (рисунок 9 Д-Е), и поэтому находятся дальше от активного центра, что похоже на структуру апо формы CfaRihC. На основании этого структурного сравнения, можно предположить, что эти участки, а также остатки D20 и N45 в LreRihC могут изменять своё положение в пространстве при связывании субстрата, как это видно из холо структур.



**Рис.10.** Активный центр LreRihC (показан зелёным, А) и BanRihC (показан сиреневым, Б). Лиганд из структуры BanRihC показан голубым на обеих панелях. Активные центры CfaRihC в комплексе с ингибитором рAPIR (ингибитор показан голубым, В) и в виде апо формы (Г) показаны оранжевым в одинаковой ориентации. Остатки, координирующие азотистое основание субстрата показаны жёлтым цветом. Водородные связи и солевые мостики показаны серыми пунктирными линиями, а важные расстояния нанесены оранжевым. Ионы кальция на панелях А–В и ион калия на панели Г показаны синими сферами

Дополнительно были сравнены структуры CfaRihC в апо (1MAS) и холо (2MAS) формах, чтобы определить, насколько сильно меняется конформация белка при связывании ингибитора, соответствующего переходному состоянию при катализе (рисунок 11 А). Из рисунка 11 А видно, что при связывании субстрата (поскольку ингибитор рAPIR соответствует переходному состоянию при связывании субстрата и катализе) происходят изменения в конформации RihC, однако в целом структуры накладываются хорошо. Участки, выделенные овалами, соответствуют участкам, которые не были разрешены в кристаллической структуре LreRihC. В связи с этим с помощью моделирования данные участки были разрешены, наложение представлено на рисунке 11 Б. Из этой же панели видно, что новые разрешённые участки не содержат никаких упорядоченных элементов вторичной структуры белков. Это может играть ключевую роль в катализе LreRihC и объяснить довольно высокие каталитические константы, поскольку при наложении модели LreRihC и кристаллических структур CfaRihC (1MAS и 2MAS) и LmaRihC (1EZR) было обнаружено, что вблизи активного центра все три кристаллические структуры имеют удлинённую (в сравнении с LreRihC)  $\alpha$ -спираль (рисунок 11 В). И CfaRihC, и LmaRihC были выбраны, поскольку для обоих ферментов есть известные кинетические параметры.



**Рис.11.** (А) Сравнение кристаллических структур CfaRihC 1MAS (голубой цвет) и 2MAS (сиреневый цвет), (Б) сравнение кристаллической (жёлтый цвет) и модельной (оранжевый цвет) структур LreRihC с разрешёнными участками в модели, (В) сравнение модели LreRihC, кристаллических структур CfaRihC (1MAS и 2MAS) и LmaRihC (зелёный цвет, 1EZR), (Г) сравнение модельных структур LreRihC, EcoRihC (тёмно-синий цвет) и SenRihC (фиолетовый цвет). Ионы кальция показаны синими сферами, рAPIR из 2MAS показан сиреневым (А, В). Для А, В и Г участки аминокислотных остатков 220–240 (Участок 2, как обсуждалось для рисунка 9) и 75–85 (часть Участка 3, как обсуждалось для рисунка 9) показаны овалами (верхний овал для Участка 2 и нижний овал для Участка 3). Для Б овалами показаны участки, разрешённые при моделировании (совпадающие с вышеупомянутыми участками)

Поскольку только для CfaRihC и LmaRihC из простейших имеются данные и по структуре, и по кинетике, а LreRihC является бактериальным ферментом, было решено сделать аминокислотное выравнивание всех RihC, для которых к настоящему моменту изучены кинетические параметры. Это выравнивание включает в себя вышеупомянутые CfaRihC и LmaRihC из простейших, а также бактериальные EcoRihC, SenRihC (оба фермента не имеют решёной кристаллической структуры) и исследуемый фермент LreRihC. Выравнивание показано на рисунке 12. В качестве матрицы совпадений использовали Blosum62. Участок 2, как обсуждалось выше, расположен в районе остатков 220–235 в выравнивании (нумерация по SenRihC), где 226 – это позиция, после которой в LreRihC  $\alpha$ -спираль переходит в неупорядоченный участок, но в CfaRihC и LmaRihC  $\alpha$ -спираль продолжается, делая этот элемент структуры более жёстким. Стоит отметить, что в этом плане EcoRihC и SenRihC похожи на LreRihC и поэтому тоже должны иметь в своей структуре более короткую  $\alpha$ -спираль с неупорядоченным участком за ней в этом регионе.

В связи с этим, было решено провести моделирование структур EcoRihC и SenRihC, используя AlphaFold2, и сравнить получившиеся модели с нашей моделью (рисунок 11 Г). Два интересующих участка обведены жёлтыми овалами. И хотя остатки 220–240 (верхний овал) действительно образуют короткую  $\alpha$ -спираль и неупорядоченный участок сразу за ней, как и в структуре LreRihC, можно также увидеть, что и в EcoRihC, и в SenRihC этот участок расположен в пространстве ближе к активному центру, чем в LreRihC.

Также видно, что участок в районе остатков 75–85 (нижний овал) в EcoRihC и SenRihC, хотя и является практически идентичным по вторичной структуре аналогичному участку в LreRihC, тоже находится ближе к активному центру. Возможно, структура нашего фермента более подвижна, чем у EcoRihC и SenRihC, вследствие чего полость активного центра проще адаптируется к конформационным изменениям, происходящим в ходе катализа при образовании переходного состояния и уходе азотистого основания, что может объяснить более высокие значения  $k_{cat}$  даже для наименее предпочтительный для LreRihC субстратов в сравнении с другими гидролазами RihC.



Рис.12. Аминокислотное выравнивание различных гидролаз RihC. Все выбранные ферменты имеют изученные кинетические параметры, представленные в таблице 3. Цветами отмечены остатки с определённым процентом совпадения: зелёным –  $\geq 90\%$  совпадения, жёлтым – 80-90%, оранжевым – 60-80%

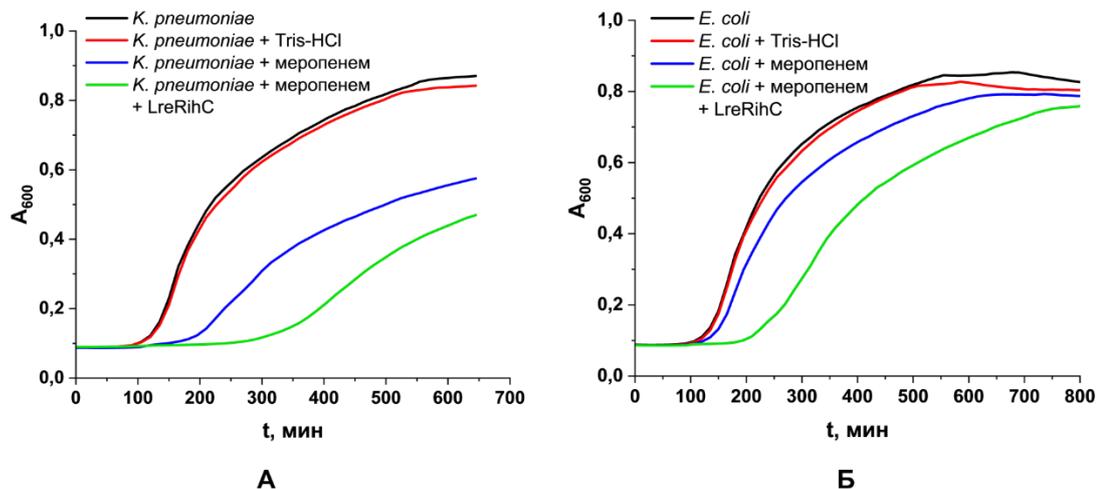
## Изучение антибактериальной активности LreRihC с патогенами

Все эксперименты по изучению антибактериальной активности проводились при сотрудничестве с учёными на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России), Санкт-Петербург, Россия.

Для исследования антибактериальной активности LreRihC были собраны и охарактеризованы тридцать пять изолятов, относящихся к группе ESKAPE, а также *Escherichia coli*. Для всех изолятов предварительно была проведена оценка МПК антибиотиков основных классов методом серийных микроразведений. Анализ данных МПК для всех изолятов показал множественную резистентность к антибиотикам у большинства из них. Таким образом, собранные изоляты представляют собой типичных представителей внутрибольничной микробиоты, связанной с генетическими линиями, накапливающими множество детерминант резистентности и представляющими серьёзную угрозу для системы здравоохранения.

С целью определения собственной антибактериальной активности фермента LreRihC были проведены эксперименты с типовыми представителями патогенов группы ESKAPE и *Escherichia coli*. Метод оценки МПК добавлением тестируемого фермента в агаризованную твёрдую среду не выявил собственную антимикробную активность LreRihC. В агаризованной среде конечные концентрации фермента составили 1,33 г/л. Протестировано 35 изолятов, ингибирования роста изолятов не выявлено. Помимо экспериментов на агаризованной среде были также проведены эксперименты в жидкой среде. Концентрации тестируемого белка LreRihC в жидкой среде методом серийных микроразведений варьировались от 0,34 г/л до 0,003 г/л. Аналогично результатам тестирования на агаризованной твёрдой среде, антибактериальная активность не обнаружена.

Так как у тестируемых препаратов не было выявлено антибактериальной активности, была проведена оценка динамики изменения плотности клеток в результате добавления в среду комбинации белкового препарата и антибиотиков основных классов. Для этого был использован планшетный спектрофотометр с функцией поддержания заданной температуры, перемешивания и считывания оптической плотности при длине волны 600 нм.



**Рис.13.** Кривые роста изолятов *K. pneumoniae* (А) и *E. coli* (Б) в присутствии меропенема и фермента LreRihC

LreRihC показал наличие синергизма с меропенемом (концентрация меропенема 16 мг/л, концентрация белка 1,33 г/л) при воздействии на *K. pneumoniae* (рис. 13 А): рост микроорганизма до оптической плотности 0,4 наблюдался за 3 часа для варианта без добавления антибиотика, за 6 часов для варианта с добавлением меропенема и за 9,25 часов для варианта с добавлением меропенема и LreRihC, при этом если культура клебсиеллы без антибиотиков за 23 часа исследований выходила на стационарную фазу жизни, то культуры с меропенемом и меропенемом в комбинации с LreRihC ещё не выходили на стационарную фазу. Синергизм был также обнаружен у LreRihC вместе с меропенемом по отношению к *E. coli* (концентрация меропенема 8 мг/л, концентрация белка 1,33 г/л; рис. 13 Б). При этом в данном случае все исследованные варианты культуры *E. coli* достигали стационарной фазы жизни за 13 часов исследований, однако присутствие антибиотика и фермента замедляло выход культуры на экспоненциальную фазу роста (начало экспоненциальной фазы роста наблюдалось примерно через 2 часа для культуры без антибиотиков, 2,5 часа для культуры с меропенемом и 3,75 часов для культуры с меропенемом и LreRihC). Оптическая плотность 0,4 достигалась за 3,5 часа для культуры *E. coli* без антибиотиков, за 4 часа – с добавлением меропенема и за 6,25 часов – с добавлением меропенема и LreRihC.

Пример результатов оценки биоплёнкообразования представлен в таблице 3. В качестве положительного контроля выступал сам изолят без добавления других веществ, в качестве отрицательного контроля выступала стерильная питательная среда. Белок LreRihC хранился и использовался в буфере Tris-HCl pH 7,5, поэтому для дополнительного контроля делали эксперимент с добавлением отдельно этого буфера к тестируемому изоляту. Для отрицательного контроля значения ОПО(1-3) и ОПОср – это, соответственно, значения ОПК(1-3) и ОПКср, используемые для расчёта значения ОПК и оценки полученных данных по биоплёнкообразованию. В сумме эффективность биоплёнкообразования собственная и при добавлении тестируемого белка была оценена для 20 изолятов различных микроорганизмов.

Для полуколичественного определения биоплёнкообразующей способности штамма рассчитывали среднее значение оптической плотности 9 опытных лунок (ОПОср). Для отрицательного контроля рассчитывали значение по формуле  $ОПК = ОПКср + 3\sigma$ , где: ОПК – оптическая плотность контроля, ОПКср – среднее значение оптической плотности контроля,  $\sigma$  – стандартное отклонение. Если  $ОПК \sim ОПОср$ , то способность штамма формировать биоплёнку отсутствует. Если  $ОПК < ОПОср < 2*ОПКср$ , то способность штамма формировать биоплёнку низкая. Если  $2*ОПК < ОПОср < 4*ОПК$ , то способность штамма формировать биоплёнку умеренная. Если  $4*ОПК < ОПОср$ , то способность штамма формировать биоплёнку высокая.

**Таблица 3** Результаты оценки биоплёнкообразования изолята *K. pneumoniae* 1989 под воздействием тестируемого фермента LreRihC.

	Буфер Tris-HCl	LreRihC	Положительный контроль	Отрицательный контроль
<b>ОПО1</b>	1,49	0,33	2,08	0,13
<b>ОПО2</b>	1,41	0,63	1,23	0,13
<b>ОПО3</b>	1,55	0,63	1,61	0,13
<b>ОПОср</b>	1,48	0,53	1,64	0,13
<b><math>\sigma</math></b>				0,0012
<b>ОПК</b>				0,13
<b>Вывод о способности к биоплёнкообразованию</b>	Высокая	Умеренная	Высокая	

При подробном сравнении оптических плотностей оказалось, что белок LreRihC снижает эффективность биоплёнкообразования у следующих штаммов: *K. pneumoniae* 1989 (примерно в 3 раза), *K. pneumoniae* 3885 (примерно в 1,5 раза), *E. coli* 3676 (примерно в 7 раз), *E. cloacae* 3514 (примерно в 2 раза), *P. aeruginosa* 3651 (примерно в 1,5 раза), *P. aeruginosa* 3611 (примерно в 1,5 раза). Примечательно то, что все организмы, по отношению к которым LreRihC проявлял положительный эффект (ухудшение эффективности образования биоплёнок), являются грамотрицательными, и среди этих организмов присутствует два штамма *K. pneumoniae*. Полученные данные, безусловно, являются любопытными и могут объяснить роль данного фермента при синтезе лактобактериями в ответ на клецсиеллы.

## ВЫВОДЫ

1) Впервые получен рекомбинантный фермент RihC из бактерий *Limosilactobacillus reuteri* LR1 в виде двух форм с добавлением His-tag на N- или C-конец фермента. Показано, что фермент RihC\_HisN экспрессируется примерно в 3 раза лучше, чем фермент RihC\_HisC. Оба фермента получены в высокоочищенном состоянии.

2) Разработана новая экспрессная эффективная универсальная методика определения активности ферментов семейства Rih. С помощью разработанной методики изучены кинетические параметры обеих форм фермента, кинетика термоинактивации, показана роль кальция в активном центре.

3) Каталитические константы LreRihC являются на настоящий момент самыми высокими из изученных для ферментов класса RihC, при этом каталитические константы формы RihC\_HisN выше, чем у формы RihC\_HisC. Значения констант Михаэлиса по всем изученным субстратам не зависят от положения His-tag и хорошо согласуются с данными ферментативной активности RihC из других источников. Инактивация при повышенных температурах происходит необратимо и в одну стадию, при этом при температурах ниже 55°C фермент является достаточно стабильным.

4) Получены кристаллы RihC\_HisN и решена пространственная структура. Показано, что фермент существует в виде тетрамера. Проведено сравнение различных структур RihC с полученной в данной работе структурой LreRihC, определены ключевые остатки активного центра для данного фермента, показана роль иона кальция в катализе.

5) Показано, что LreRihC не обладает собственной антибактериальной активностью против патогенов группы ESKAPE, однако имеет синергизм с меропенемом против некоторых штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* при росте этих организмов в жидкой питательной среде. Также показано, что данный фермент снижает эффективность образования биоплёнок для некоторых штаммов *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Shaposhnikov L.A. et al. Ribonucleoside hydrolases – structure, functions, physiological role and practical uses / **Shaposhnikov L.A.**, Savin S.S., Tishkov V.I., Pometun A.A. // *Biomolecules*. – 2023. – V. 13. – № 1375. doi: /10.3390/biom13091375 (объемом 1,56 п.л., вклад автора 80%) [**Q1, импакт-фактор WoS JIF = 5,5**]
2. Шапошников Л.А. и др. Лактобактерии и клебсиеллы: две противоположности в борьбе за здоровье организма / **Шапошников Л.А.**, Тишков В.И., ПOMETун А.А. // *Успехи биологической химии*. – 2024. – Т. 64. – С. 143-178.  
Shaposhnikov L.A. et al. Lactobacilli and Klebsiella: Two Opposites in the Fight for Human Health / **Shaposhnikov L.A.**, Tishkov V.I., Pometun A.A. // *Biochemistry (Moscow)*. – 2024. – V. 89. – № S1 – P. S71-S89. doi: 10.1134/S0006297924140050 (объемом 2,25 п.л., вклад автора 80%) [**импакт-фактор WoS JIF = 2,8**]
3. Shaposhnikov L.A. et al. Development of an Approach to Determining Enzymatic Activity of Ribonucleoside Hydrolase C Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography / **Shaposhnikov L.A.**, Chikurova N.Yu., Chernobrovkina A.V., Tishkov V.I., Pometun A.A. // *Journal of Chromatography A*. – 2024. – V. 1715. – № 464561. doi: /10.1016/j.chroma.2023.464561 (объемом 0,5 п.л., вклад автора 60%) [**Q1, импакт-фактор WoS JIF = 4,1**]
4. Shaposhnikov L.A. et al. Structure-functional examination of novel ribonucleoside hydrolase C (RihC) from *Limosilactobacillus reuteri* LR1 / **Shaposhnikov L.A.**, Chikurova N.Yu., Atroshenko D.L., Savin S.S., Kleymenov S.Yu., Chernobrovkina A.V., Pometun E.V., Minyaev M.E., Matyuta I.O., Hushpulian D.M., Boyko K.M., Tishkov V.I., Pometun A.A. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – V. 25. – № 1. – P. 538-558. doi: 10.3390/ijms25010538 (объемом 1,31 п.л., вклад автора 50%) [**Q1, импакт-фактор WoS JIF = 5,6**]