

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

ФГУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

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

Диссертация

на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научные руководители:

доктор химических наук,
профессор В.И. Тишков

доктор химических наук,
А.А. Пометун

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. ВВЕДЕНИЕ	5
1.1. Актуальность и степень разработанности темы исследования	5
1.2. Цели и задачи исследования.....	6
1.3. Научная новизна.....	6
1.4. Практическая значимость работы.....	6
1.5. Методология и методы исследования.....	7
1.6. Личный вклад автора	7
1.7. Положения, выносимые на защиту	8
1.8. Степень достоверности и апробация работы.....	9
1.9. Публикации	9
1.10. Связь работы с государственными программами.....	9
1.11. Структура и объём работы.....	9
II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
2.1. Пробиотические свойства <i>L. reuteri</i>	10
2.1.1. Колонизация кишечника бактериями <i>L. reuteri</i>	10
2.1.2. Синтез метаболитов у <i>L. reuteri</i> для оздоровительного эффекта	12
2.1.3. Модуляция микробиоты хозяина штаммами <i>L. reuteri</i>	16
2.1.4. Роль <i>L. reuteri</i> в иммуномодуляции	18
2.1.5. Роль <i>L. reuteri</i> в нейромодуляции.....	20
2.1.6. Роль <i>L. reuteri</i> в лечении гиперпроницаемости кишечника	20
2.2. Общие физиологические свойства ферментов семейства Rih	21
2.3. Структура рибонуклеозидгидролаз	26
2.3.1. Аминокислотные последовательности Rih.....	26
2.3.2. Пространственная структура Rih.....	40
2.4. Каталитические свойства гидролаз Rih	45
2.5. Стабильность гидролаз Rih.....	51
2.6. Практическое применение гидролаз Rih	52
III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	56
3.1. Материалы	56
3.2. Методы исследования.....	57
3.2.1. Получение модельных структур белка	57
3.2.2. Получение генетических конструкций RihC.....	57
3.2.3. Экспрессия фермента в клетках <i>E. coli</i>	59
3.2.4. Выделение и очистка фермента	59
3.2.5. Определение олигомерного состава фермента.....	61
3.2.6. Синтез сорбентов для измерения активности фермента	61

3.2.7. Заполнение хроматографических колонок	61
3.2.8. Постановка ферментативной реакции	61
3.2.9. Проведение анализа с помощью ГИХ	62
3.2.10. Определение кинетических параметров RihC	63
3.2.11. Изучение термостабильности фермента.....	63
3.2.12. Кристаллизация и сбор данных.....	64
3.2.13. Решение и уточнение структуры	65
3.2.14. Анализ и валидация структуры.....	65
3.2.15. Изучение антибактериальной активности фермента RihC и его влияния на образование биоплёнок.....	65
IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	68
4.1. Выбор фермента для клонирования	68
4.2. Моделирование структуры LreRihC.....	68
4.3. Получение фермента LreRihC с His-tag	70
4.4. Определение олигомерного состава фермента.....	72
4.5. Разработка методики определения активности RihC	73
4.6. Кинетические параметры LreRihC	76
4.7. Температурная стабильность LreRihC.....	81
4.8. Общая структура и активный центр LreRihC	83
4.9. Изучение антибактериальной активности LreRihC с патогенами.....	92
V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
VI. ВЫВОДЫ	98
VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	99

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

RihC – рибонуклеозидгидролаза C

IG-NH – инозин-гуанозин-предпочитающая нуклеозидгидролаза

IAG-NH – инозин-аденозин-гуанозин-предпочитающая нуклеозидгидролаза

RihA – рибонуклеозидгидролаза A

RihB – рибонуклеозидгидролаза B

LreRihC – рибонуклеозидгидролаза C из *Limosilactobacillus reuteri* LR1

His-tag – последовательность из шести аминокислотных остатков гистидина

RihC_HisN – рибонуклеозидгидролаза C из *L. reuteri* с добавлением His-tag на N-конец

RihC_HisC – рибонуклеозидгидролаза C из *L. reuteri* с добавлением His-tag на C-конец

EcoRihC - рибонуклеозидгидролаза C из *Escherichia coli*

CfaRihC - рибонуклеозидгидролаза C из *Crithidia fasciculata*

SenRihC - рибонуклеозидгидролаза C из *Salmonella enterica*

LmaRihC - рибонуклеозидгидролаза C из *Leishmania major*

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГИХ – гидрофильная хроматография

NaPB – натрий-фосфатный буфер

pAPIR – пара-аминофенилиминорибитол, p-aminophenyliminoribitol

ESKAPE – группа из шести высоковирулентных антибиотикорезистентных патогенов, в которые входят *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp*

I. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность и степень разработанности темы исследования

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 [1]. Известно, что при обработке антибактериальными агентами эти бактерии переходят в состояние биоплёнки, в котором их устойчивость значительно повышается [2]. 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 биоплёнок [3]. 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* [4]. 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 спектроскопии 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, IAG-NH, RihA, RihB 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

[5,6]. Не до конца ясна физиологическая роль данного фермента в лактобактериях и то, почему он синтезируется именно в ответ на присутствие патогенов.

1.2. Цели и задачи исследования

Целью данной работы является клонирование гена, кодирующего фермент 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*.

1.3. 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 каталитическими параметрами. Изучена антибактериальная активность этого фермента как собственная, так и в комплексе с известными антибиотиками, а также влияние на эффективность образования биоплёнок.

1.4. 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.

1.5. 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).

1.6. 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.

1.7. 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 идёт. 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*, а также

обладает синергизмом с меропенемом против *K. pneumoniae* и *E. coli*, замедляя рост этих организмов.

1.8. 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)".

1.9. 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).

1.10. Связь работы с государственными программами

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ), грант № 23-64-10029.

1.11. 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.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Пробиотические свойства *L. reuteri*

Существуют некоторые базовые факторы для того, чтобы рассматриваемый штамм мог быть потенциальным пробиотиком: выживаемость в среде с низким рН и присутствием ферментов, способность прикрепляться к эпителию для взаимодействия между хозяином и пробиотиком, конкуренция с патогенными микроорганизмами. *L. reuteri* отвечает всем этим требованиям. Следует рассмотреть дополнительные пробиотические свойства *L. reuteri*, которые способствуют его разнообразному благоприятному воздействию на здоровье хозяина, а также на профилактику и/или улучшение состояния организма (рис.1).

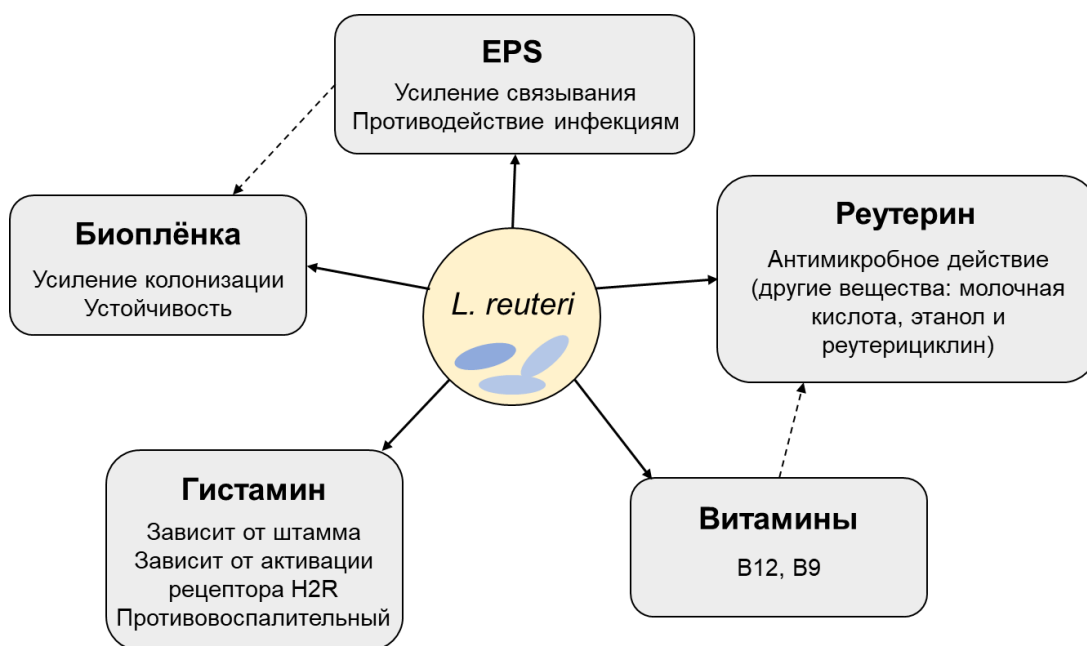


Рис.1. Пробиотические свойства *L. reuteri*. EPS – экзополисахарид.

2.1.1. Колонизация кишечника бактериями *L. reuteri*

Некоторые участки ЖКТ, участвующие в пищеварении и абсорбции, имеют очень неблагоприятные условия для колонизации микроорганизмами. Например, это низкая величина рН, вызванная желудочными кислотами и солями желчи в верхней части тонкого кишечника. Поэтому прежде всего для того, чтобы колонизировать ЖКТ, нужно выживать в таких условиях. Многие штаммы *L. reuteri* устойчивы к низким значениям рН и солям желчи [7,8]. Считается, что эта устойчивость по крайней мере частично зависит от способности этих бактерий образовывать биоплёнки [9].

L. reuteri способны прикрепляться к муцину и эпителию кишечника, а некоторые штаммы могут прикрепляться к эпителиальным клеткам кишечника у ряда позвоночных хозяев [10]. Возможным механизмом адгезии является связывание бактериальных

поверхностных молекул со слоем слизи. Слизистосвязывающие белки (ССБ, MUB) и ССБ-подобные белки, кодируемые *Lactobacillales*-специфичными кластерами генов, кодирующих ортологичный белок, служат в качестве медиаторов адгезии или так называемых адгезинов [11,12]. Значительное разнообразие ССБ среди штаммов *L. reuteri* и различия в численности ССБ на клеточной поверхности коррелируют со способностью этих бактерий связывать слизь [13]. Специфичная для штамма роль ССБ в распознавании слизистых элементов и/или их способности стимулировать агрегацию может объяснить вклад ССБ в способность *L. reuteri* связываться с кишечником. Факторы, которые помогают прикрепляться к поверхностям, включают многочисленные крупные поверхностные белки [14], MUB A [15], глюкозилтрансферазу A (GtfA) и инулосахаразу (Inu) [16] и сложный эфир D-аланина [17].

Поскольку *L. reuteri*, обитающие в ЖКТ хозяина, могут образовывать биоплёнки, были предприняты попытки изучить регуляцию образования биоплёнки *L. reuteri* и её связь с присоединением бактерий к эпителию ЖКТ хозяина. Проводя анализ биоплёнки *in vitro*, был раскрыт вклад GtfA и Inu в формирование биоплёнки *L. reuteri* TMW1.106 [16]. Образование *in vivo* биоплёнки штаммов *L. reuteri*, по-видимому, зависит от происхождения штаммов-хозяев. В одном исследовании девять штаммов *L. reuteri*, выделенных от разных хозяев (человека, мыши, крысы, курицы и свиньи), давали мышам без кишечной микрофлоры, получившиеся биоплёнки оценивали через 2 дня. Оказалось, что только штаммы, выделенные из грызунов, были способны образовывать биоплёнки и прилипать к эпителию переднего желудка, хотя популяции кишечного просвета были сопоставимы среди штаммов различного происхождения [18]. Другое исследование показало, что специализированный транспортный путь (система SecA2-SecY2) уникален у штаммов, выделенных из грызунов и свиней [19]. Используя штамм грызунов *L. reuteri* 100-23, провели сравнение внеклеточных и связанных с клеточной стенкой белков между штаммом дикого типа и мутантом secA2. У мутанта secA2 отсутствовал только один поверхностный белок *L. reuteri* 70902. Исследования колонизации *in vivo* показали, что отсутствие *L. reuteri* 70902 приводит к почти полностью исключённому образованию биоплёнки. Это свидетельствует о том, что *L. reuteri* 70902 и система SecA2-SecY2 являются ключевыми факторами, регулирующими продукцию биоплёнки из *L. reuteri* 100-23 у мышей, не содержащих данных микроорганизмов [18]. Также была исследована роль двухкомпонентных систем bfrKRT и semAKR в формировании биоплёнки *in vitro* *L. reuteri* 100-23 [20]. Было обнаружено, что делеция определенных генов в оперонах усиливает адгезию и образование биоплёнки. Тем не менее, вклад систем bfrKRT и semAKR в

формирование биоплёнки *in vivo* ещё предстоит выяснить. Роль экзополисахарида (ЭПС, EPS) в содействии колонизации была также исследована с *L. reuteri* 100-23. Экспрессия EPS была исключена из-за мутации гена фруктозилтрансферазы (FTF) [21]. После введения мышам, не имеющим лактобактерии, по сравнению со штаммом дикого типа, колонизация мутанта FTF в переднем желудке и слепой кишке была в значительной степени нарушена. Это указывает на то, что продукция EPS может усиливать колонизирующую способность штамма 100-23 в кишечнике. Интересно то, что *L. reuteri* RC-14 способен проникать в зрелую биоплёнку кишечной палочки и становиться её частью [22]. *L. reuteri* был также доставлен в виде биоплёнки на микросфере, и было обнаружено, что такая доставка способствует прилипанию *L. reuteri* к кишечному эпителию и повышает его пробиотические свойства [23,24].

2.1.2. Синтез метаболитов у *L. reuteri* для оздоровительного эффекта

Антимикробные и иммуномодулирующие эффекты штаммов *L. reuteri* связаны с их профилем синтеза метаболитов. Стоит рассмотреть эти метаболиты и их пробиотическое действие подробнее.

Реутерин

Большинство штаммов *L. reuteri* человеческого и птичьего происхождения способны продуцировать и выделять хорошо известное антимикробное соединение реутерин [25–27]. Реутерин представляет собой смесь различных форм 3-гидроксипропиональдегида (3-ГПА) [28]. Известно, что *L. reuteri* может метаболизировать глицерин с образованием 3-ГПА в кофермент В12-зависимой, опосредованной глицерином, дегидратазной реакции [29,30]. Образование 3-ГПА также было продемонстрировано у нескольких других видов бактерий [31]. Тем не менее, *L. reuteri* уникальны своей способностью продуцировать и секретировать 3-ГПА больше, чем нужно клетке биоэнергетически [32]. Более того, антимикробная активность реутерина, по-видимому, зависит от самопроизвольного превращения 3-ГПА в цитотоксический электрофил акролеин [33]. Реутерин может ингибировать широкий спектр микроорганизмов, в основном грамотрицательных [34]. Очевидно, что большая часть видов бактерий *Lactobacillus* устойчива к реутерину, среди них наиболее устойчивы штаммы *L. reuteri* [26]. В дополнение к своему антимикробному действию реутерин способен конъюгировать гетероциклические амины, что также, по-видимому, зависит от образования акролеина [33]. Это говорит о том, что акролеин является важным соединением в активности реутерина.

Таблица 1. Клиническая эффективность *L. reuteri* против *H. pylori*

Штамм	Длительность лечения	Субъекты	Результат	Ссылка
<i>L. reuteri</i> DSM 17648	14 дней	Взрослые	Уменьшение патогенной нагрузки в ЖКТ	[35]
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	20 дней	Пациенты	На 93% успешное уничтожение патогена с применением ингибитор-тетрациклин-метронидазол – <i>L. reuteri</i> терапии	[36]
	8 недель	Пациенты	Уменьшение уреазной активности в терапии пантопрозолем	[37]
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	10 дней	Больные дети	Улучшение симптомов инфекции ЖКТ	[38]
	7 дней	Пациенты	Нет улучшений в стандартной тройной терапии	[39]
	4 недели	Пациенты	Значительное уменьшение патогенной нагрузки и улучшение симптомов диспепсии	[40]
<i>L. reuteri</i> SD2112	4 недели	Пациенты	Уменьшение количества патогена и подавление уреазной активности	[41]
<i>L. reuteri</i> DSMZ 17648	14 дней	Пациенты	Уменьшение патогенной нагрузки	[42]
<i>L. reuteri</i> DSM 17938, ATCC PTA 6475	Во время терапии	Пациенты	Уменьшение побочных эффектов от антибиотиковой терапии	[43]

Кроме реутерина, были определены некоторые другие противомикробные вещества, такие как молочная кислота, уксусная кислота, этанол и реутерициклин как продукты некоторых штаммов *L. reuteri* [27]. Наличие этих веществ показало, что *L. reuteri* эффективны против различных бактериальных инфекций ЖКТ. Эти инфекции включают *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Clostridium difficile* и *Salmonella* [44,45]. Одним из наиболее ярких примеров эффективности *L. reuteri* в качестве пробиотика против инфекций является использование *L. reuteri* для борьбы с *H. pylori*. Инфекция *H. pylori* является основной причиной хронического гастрита и язвенной болезни, а также фактором риска злокачественных новообразований желудка [46,47]. Действие *L. reuteri* на *H. pylori* было

изучено во многих исследованиях (Таблица 1). Предполагается, что *L. reuteri* конкурирует с *H. pylori* и ингибирует его связывание с гликолипидными рецепторами [48]. Конкуренция снижает бактериальную нагрузку *H. pylori* и уменьшает связанные с ней симптомы [40]. Некоторые исследования показали, что *L. reuteri* обладает потенциалом для полного уничтожения *H. pylori* [49]. Следует отметить, что *L. reuteri* хорошо подходит для лечения *H. pylori*, так как эти бактерии уничтожают патоген, не вызывая общих побочных эффектов, связанных с терапией антибиотиками [43].

Были также проведены исследования для определения положительного действия *L. reuteri* против вирусов и грибков. Есть данные, свидетельствующие о преимуществах *L. reuteri* при использовании и против пневмовирусов, цирковирусов, ротавирусов, коксакивирусов и папилломавирусов [50–52]. Предположительно, *L. reuteri* противодействуют вирусной инфекции, регулируя микробиоту и секретируя метаболиты, которые имеют противовирусные компоненты [53]. Кроме того, некоторые исследования показывают, что *L. reuteri* также могут обладать противогрибковыми свойствами, так как *L. reuteri* останавливают рост и в конечном итоге убивают различные виды *Candida* [54].

Гистамин

Некоторые штаммы *L. reuteri* способны превращать аминокислоту L-гистидин, компонент пищи, в биогенный амин гистамин [27]. Комменсальную бактерию человека *L. reuteri* 6475 использовали в качестве модельного штамма для изучения образования и роли гистамина у *L. reuteri*. Было обнаружено, что гистамин, полученный из *L. reuteri* 6475, подавляет выработку фактора некроза опухоли (TNF) из стимулированных человеческих моноцитов [55]. Это подавление зависело от активации гистаминового H₂-рецептора, увеличения внутриклеточного цАМФ и протеинкиназы A и ингибирования передачи сигналов MEK/ERK. Синтез гистамина и последующая функция подавления TNF *in vitro* регулируются с помощью полного кластера хромосомного гена гистидиндекарбоксилазы (*hdc*), который содержит гены *hdcA*, *hdcB* и *hdcP* [55]. Также было обнаружено, что пероральное введение *hdc*⁺ *L. reuteri* может эффективно подавлять воспаление кишечника на модели индуцированного тринитробензолсульфокислотой (TNBS) мышинного колита [56]. Кроме того, внутрибрюшинное введение супернатанта культуры *L. reuteri* 6475 мышам, которым до этого вводили TNBS, приводила к аналогичному ослаблению колита. Эти результаты указывают на участие метаболитов *L. reuteri*, включая гистамин, в иммуномодуляции кишечника [57]. Дальнейшие исследования показали, что ген *rsiR* необходим для экспрессии кластера генов *hdc* в *L. reuteri* 6475 [58]. Инактивация гена *rsiR* приводила к снижению ингибирования TNF *in vitro* и снижению противовоспалительной

функции *in vivo*. Кроме того, как подавление TNF *in vitro*, так и антиколитовые эффекты *in vivo*, по-видимому, регулируются геном *folC2* [57]. Нокаут гена *folC2* привёл к подавлению кластера гена *hdc* и уменьшению производства гистамина. Производство гистамина *L. reuteri* сильно зависит от штамма, и большинство исследований было сосредоточено на штаммах человеческого происхождения [26].

Витамины

Существует 13 незаменимых витаминов для человека из-за неспособности человеческого организма их синтезировать [59]. Как и многие другие виды *Lactobacillus*, некоторые штаммы *L. reuteri* способны продуцировать различные типы витаминов, включая витамин B12 (кобаламин) и B9 (фолат). Как упоминалось ранее, B12 важен для производства реутерина, потому что превращение глицерина в 3-ГПА требует B12-зависимого кофермента. К настоящему времени было обнаружено, что, по меньшей мере 4 штамма *L. reuteri* с различным происхождением продуцируют B12 [60]. Среди этих штаммов наиболее изучены *L. reuteri* CRL1098 и *L. reuteri* JCM1112 [61]. Было показано, что введение *L. reuteri* CRL1098 вместе с диетой, в которой не хватает витамина B12, улучшает патологию у беременных самок мышей с дефицитом B12 и их потомков [62]. Это указывает на потенциальное применение *L. reuteri* при лечении дефицита B12. В дополнение к B12, фолат также может быть синтезирован некоторыми специфическими штаммами *L. reuteri*, включая *L. reuteri* 6475 и *L. reuteri* JCM1112 [57].

Экзополисахарид (EPS)

EPS, продуцируемый *L. reuteri*, важен для формирования биоплёнки и адгезии *L. reuteri* к эпителиальным поверхностям [9]. Кроме того, EPS, синтезированный *L. reuteri*, способен ингибировать адгезию *E. coli* к эпителиальным клеткам свиньи *in vitro* [63]. Что ещё более важно, EPS-опосредованная блокировка адгезии также подавляет экспрессию генов провоспалительных цитокинов, которые индуцируются инфекцией *E. coli*, включая IL-1 β и IL-6. Дальнейшие эксперименты *in vivo* на поросятах показали аналогичные результаты в том, что EPS, происходящий из *L. reuteri*, предотвращал диарею поросят при бактериальной инфекции путём снижения адгезии *E. coli* [64]. Кроме того, EPS из *L. reuteri*, как сообщается, подавляет связывание энтеротоксигенной кишечной палочки с эритроцитами свиньи [65]. Также было показано, что EPS, продуцируемый *L. reuteri* 100-23 из грызунов, индуцирует Foxp3⁺ регуляторные T-клетки (Treg) в селезёнке [21]. Напротив, штамм *L. reuteri* 100-23 с мутацией *ftf*, которая блокирует производство EPS, не индуцировал селезёночные Treg-клетки. Это говорит о том, что EPS необходим для

опосредованной *L. reuteri* индукции клеток Treg и указывает на возможность использования дикого типа *L. reuteri* 100-23 для лечения дефицита Treg.

2.1.3. Модуляция микробиоты хозяина штаммами *L. reuteri*

Микробиота и иммунная система взаимодействуют для поддержания гомеостаза тканей у здоровых людей [66]. Многие заболевания связаны с нарушением микробиоты [67], тогда как было продемонстрировано, что восстановление микробиоты предотвращает или облегчает некоторые заболевания [68]. *L. reuteri* может влиять на разнообразие, состав и метаболическую функцию кишечных, оральных и вагинальных микробиот. Эти эффекты в значительной степени специфичны для данного вида лактобактерий [69,70].

Микробиота кишечника

Исследования показали модулирующее действие *L. reuteri* на микробиоту грызунов, поросят и людей. В одном из исследований оценивалось пероральное введение штамма *L. reuteri* человеческого происхождения (DSM17938) мышам, страдающим отёчностью, у которых наблюдается микробный дисбиоз кишечника вследствие мутации гена *foxp3*. Результаты показали, что этот штамм *L. reuteri* был способен продлить продолжительность жизни мышей и уменьшить воспаление многих органов при ремоделировании микробиоты кишечника [71]. Изменения кишечной микробиоты включали увеличение в типе *Firmicutes* и родах *Lactobacillus* и *Oscilospira*. Эффект *L. reuteri*, уменьшающий заболевание, был обусловлен изменённой микробиотой кишечника, хотя состав сообщества по-прежнему отличался от однопомётных особей дикого типа. Дальнейшие исследования показали, что продуцирование инозина усиливалось микробиотой кишечника при введении *L. reuteri*. При взаимодействии с аденозиновым рецептором A_{2A} инозин может восстанавливать клетки Th₁/Th₂ и связанные с ними цитокины. Эти результаты позволяют предположить, что ось рецептора A_{2A} *L. reuteri* – кишечная микробиота – инозин – аденозин служит потенциальным терапевтическим методом для Treg-дефицитных нарушений. Кроме того, пероральное введение *L. reuteri* 6475 привело к большему разнообразию микробиоты как в тонкой, так и в подвздошной кишке на примере мышей с индуцированной овариэктомией потери кости [72]. Однако вопрос о том, была ли изменённая микробиота кишечника напрямую связана с профилактикой потери костной массы, требует дальнейшего изучения. Также было показано, что *L. reuteri* C10-2-1 влияет на разнообразие кишечной микробиоты в подвздошной кишке крыс [73].

По сравнению с младенцами, родившимися вагинально, дети, родившиеся с помощью кесарева сечения, имеют более высокую распространённость энтеробактерий, но

меньше бифидобактерий в микробиоте кишечника [70]. При лечении детей в возрасте от 2 недель до 4 месяцев, родившихся кесаревым сечением, *L. reuteri* DSM 17938 модулировал развитие кишечной микробиоты таким же образом, как и у детей, родившихся традиционным способом [70]. Структура кишечной микробиоты у детей, родившихся через влагалище, оставалась неизменной при добавлении *L. reuteri*. В другом исследовании лечение детей тем же штаммом *L. reuteri* приводило к снижению анаэробных грамотрицательных и повышению грамположительных бактерий в кишечной микробиоте, тогда как численность энтеробактерий и энтерококков в значительной степени снижалась при обработке *L. reuteri* [74]. Различия в возрасте младенцев, продолжительности лечения, путях введения и дозировке могут объяснить различия в результатах двух исследований.

Для взрослых людей *L. reuteri* NCIMB 30242, вводимый в виде капсул с пролонгированным высвобождением в течение 4 недель, был способен увеличить соотношение *Firmicutes* и *Bacteroidetes* у здоровых людей [75]. Известно, что этот штамм *L. reuteri* способен активировать гидролазу солей желчных кислот и, таким образом, влияет на увеличение циркуляции желчных кислот [76]. Повышенная регуляция циркулирующей желчной кислоты была предложена в качестве причины модулированной кишечной микробиоты [76]. У пациентов с сахарным диабетом 2 типа несмотря на то, что 3 месяца приёма *L. reuteri* DSM 17938 значительно не изменили микробную структуру кишечника, повысился индекс чувствительности к инсулину и сывороточный уровень вторичной желчной дезоксихолевой кислоты [77]. Кроме того, введение штамма *L. reuteri* DSM 17938 пациентам с муковисцидозом (МВ) помогло при дисбактериозе микробиоты кишечника, уменьшив содержание протеобактерий, а также увеличив относительную численность *Firmicutes* [78]. Однако вопрос о том, способствовала ли модулированная микробиота кишечника улучшению здоровья желудочно-кишечного тракта у пациентов с МВ, получавших пробиотики, требует дальнейшего изучения.

L. reuteri влияет на микробиоту кишечника у поросят специфическим для штамма образом. Например, пероральное введение *L. reuteri* ZLR003 способно изменить как разнообразие, так и количественный состав кишечной микробиоты [79]. Однако введение штамма *L. reuteri* I5007 не повлияло на микробную структуру толстой кишки у поросят [80]. Корм, ферментированный *L. reuteri*, изменил численность 6 различных бактериальных таксонов, в частности семейства *Enterobacteriaceae*, у поросят-отъёмшей [81]. Тем не менее, основные изменения, включая увеличение числа *Mitsuokella* и уменьшение семейства под типом *Bacteroidetes*, можно было увидеть только с *L. reuteri* TMW1.656, но не с *L. reuteri* LTH5794. TMW1.656 является штаммом, продуцирующим реутерициклин, а

LTH5794 – нет, что свидетельствует о возможном вкладе реутерициклина в модуляцию кишечной микробиоты у поросят [81].

Микробиота полости рта

Бактерии родов *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria* наиболее распространены в микробиоме ротовой полости человека [82]. В рандомизированном контролируемом исследовании 12-недельное ежедневное потребление двух штаммов *L. reuteri* – DSM 17938 и РТА 5289 – привело к изменению состава микробиоты полости рта, хотя разнообразие видов бактерий не изменилось [82]. Изменения исчезли через 4 недели после прекращения лечения, что указывает на быструю смену микробиома полости рта. В другом исследовании, проведённом на человеке, оральное лечение *L. reuteri* уменьшало количество пародонтальных патогенов в субгингивальной микробиоте, хотя клинического воздействия не наблюдалось [83].

Микробиота влагалища

Лактобактерии доминируют во влагалищном бактериальном сообществе здоровых женщин [84]. Было показано, что только 14 дней перорального введения *L. reuteri* RC-14 могут восстановить нормальную микрофлору влагалища у женщин в постменопаузе [85]. Относительная распространённость лактобактерий в значительной степени снижается у пациентов с бактериальным вагинозом [84]. В общей сложности 4 недели приёма внутрь капсул, содержащих два штамма, включая *L. reuteri* RC-14, увеличили относительную распространённость лактобактерий. Подобное увеличение лактобактерий наблюдалось, когда *L. reuteri* RC-14 вводили вагинально вместе со штаммом *L. rhamnosus* [86]. Тем не менее, у беременных женщин пероральное лечение *L. reuteri* RC-14 в течение 8 недель не привело к эффективному восстановлению нормальной микробиоты влагалища [87]. Это говорит о том, что *L. reuteri* RC-14 не может действовать в одиночку.

2.1.4. Роль *L. reuteri* в иммуномодуляции

L. reuteri способны повышать уровни свободного секреторного IgA (sIgA) у крыс [88]. Однако повышенная регуляция sIgA отсутствовала у крыс с дефицитом витамина А, что позволяет предположить, что *L. reuteri* функционируют зависимым от витамина А образом. У беременных потребление *L. reuteri* не влияло на уровни общего IgA или sIgA в грудном молоке [89]. Что касается действия *L. reuteri* на индукцию слюнного IgA, результаты противоречивы. Повышенные уровни IgA в слюне человека отмечались с использованием жевательной резинки, содержащей *L. reuteri* [90]. Однако в другом исследовании было показано, что *L. reuteri* не влияют на концентрацию IgA в слюне [91].

Разница в штаммах *L. reuteri*, использованных в исследованиях, может объяснить разницу в результатах. Важной общностью является то, что слюнные *L. reuteri*-позитивные индивидуумы имеют более высокие уровни слюнного IgA. Влияют ли *L. reuteri* на уровни IgA путём прямой регуляции В-клеток, требует дальнейшего изучения.

Таблица 2. Индукция клеток Treg с помощью *L. reuteri* при различных заразных и незаразных заболеваниях; БЛУ – брыжеечный лимфатический узел, ВЗК – воспалительное заболевание кишечника

Состояние здоровья	Организм	Ткань	Штамм	Ссылка
Ожирение, связанное с «западной» диетой	Мышь	БЛУ	ATCC PTA 6475	[92]
Лечение раны	Мышь	Биопсия	ATCC PTA 6475	[93]
Системная красная волчанка	Мышь	Почки	ATCC PTA 6475	[94]
Некротический энтероколит	Мышь	Кишка, БЛУ	DSM 17938	[80]
Дикий тип	Мышь	БЛУ, селезёнка	100-23	[21]
Дикий тип	Мышь	Селезёнка	ATCC 23272	[95]
Дикий тип, ВЗК, атопический дерматит	Мышь	БЛУ, ободочная кишка, ухо	ATCC 23272	[96]
ВЗК	Человек	Периферическая кровь	RC-14	[97]

Было показано, что *L. reuteri* могут индуцировать противовоспалительные клетки Treg, что, вероятно, способствует благоприятному действию *L. reuteri* в широком диапазоне как заразных, так и незаразных заболеваний (Таблица 2). Treg-индуцирующее свойство *L. reuteri* в значительной степени зависит от штамма. Однако противовоспалительное действие *L. reuteri* не всегда зависит от индукции клеток Treg. Хорошим примером является опосредованное *L. reuteri* подавление ответов Th₁/Th₂ у Treg-дефицитных мышей [71]. Некоторые штаммы *L. reuteri* способны снижать выработку многих провоспалительных цитокинов. Например, *L. reuteri* GMNL-263 может снижать сывороточные уровни MCP-1, TNF и IL-6 у мышей, которых кормят рационом с высоким содержанием жиров [98]. Схожие эффекты наблюдались и у мышей, получавших убитый нагреванием GMNL-263. Однако в некоторых случаях иммуномодулирующее действие *L. reuteri* зависит от его метаболитов, поскольку культуральный супернатант *L. reuteri* VM36301 может снижать продукцию TNF из клеток TNP-1 миелоида человека [99]. Катаболиты триптофана *L. reuteri* являются лигандами для арилуглеводородного рецептора (AhR). Активируя AhR, *L. reuteri* могут стимулировать локальную продукцию IL-22 из врождённых лимфоидных клеток (ILC) [100]. Кроме того, производные триптофана, вырабатываемые *L. reuteri*, могут

индуцировать развитие регуляторных $CD4^+CD8\alpha\alpha^+$ двойных положительных интраэпителиальных лимфоцитов AhR-зависимым образом [101]. Учитывая, что AhR является широко экспрессируемым, *L. reuteri* и их метаболиты могут влиять на многие другие типы иммунных клеток, помимо ИЛС и Т-клеток [102].

2.1.5. Роль *L. reuteri* в нейромодуляции

Кишечная микробиота играет роль в функциях кишечной нервной системы (ENS) [103]. У субъектов с истощением микробиоты наблюдается аномальное состояние ENS [103,104]. Лечение антибиотиками уменьшает количество нейронов в ENS. Это может быть связано с уменьшением нейротрофического фактора, происходящего из глиальной клеточной линии (GDNF), который может быть восстановлен стимуляцией TLR₂ [104]. Кроме того, у животных, не имеющих микробов, наблюдается дефектная морфология и возбудимость ENS, которые можно обратить путём колонизации микробиоты [105]. *L. reuteri*, в частности, могут предотвращать реакцию висцеральной боли главным образом за счёт снижения активности кишечного нерва во время давления колоректального растяжения у мышей [106]. Живые, убитые нагреванием, гамма-облучённые *L. reuteri* или даже кондиционированная среда — всё это имело сходный эффект [106]. *L. reuteri* также может продуцировать гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), основной ингибиторный нейротрансмиттер в центральной нервной системе [107]. Однако биологическая активность *in vivo* полученной ГАМК не была исследована [103]. Кроме того, *L. reuteri* могут увеличить возбудимость и число потенциалов действия в сенсорных нейронах толстой кишки крысы [108]. Эти различные эффекты *L. reuteri* могут быть связаны с различием в нейронах-мишенях [109].

2.1.6. Роль *L. reuteri* в лечении гиперпроницаемости кишечника

Физические, биохимические и иммунологические барьеры составляют барьерную функцию кишечника, которая необходима для блокирования проникновения внешних антигенов и токсинов [110]. Если в кишечном барьере возникают какие-либо нарушения, проницаемость может увеличиться, что приведёт к состоянию гиперпроницаемости кишечника. Различные пробиотики известны своей способностью усиливать барьерную функцию слизистой оболочки, примером которых являются *L. reuteri* [110]. При DSS-индуцированном колите введение *L. reuteri* может уменьшить бактериальную транслокацию из желудочно-кишечного тракта в брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ) [111]. Кроме того, обработка склонных к волчанке мышей смесью видов *Lactobacillus*, включая *L. reuteri*, приводила к более высокой экспрессии белков с плотным соединением в эпителиальных клетках кишечника [94]. Впоследствии транслокация провоспалительных

молекул, таких как липополисахариды, была значительно подавлена, что коррелировало с ослаблением заболевания. В дополнение к исследованиям на мышах было показано, что несколько штаммов *L. reuteri* обладают способностью модулировать экспрессию белка с плотным соединением и поддерживать целостность кишечного барьера у свиней [73]. Более того, способность *L. reuteri* снижать проницаемость кишечника наблюдалась у людей. У детей с атопическим дерматитом, у которых нарушение барьерной функции кишечника положительно коррелировало с патогенезом заболевания [112], лечение *L. reuteri* DSM 12246 (и *L. rhamnosus* 19070-2) значительно снизило частоту симптомов заболеваний желудочно-кишечного тракта при уменьшении отношения лактулозы к манниту [113], что отражает улучшение состояния гиперпроницаемости кишечника [114].

На основании вышеизложенной информации становится понятна польза лактобактерий и *L. reuteri*, в частности при применении в качестве пробиотика для улучшения состояния организма. Однако точный и подробный механизм антипатогенного действия назвать трудно, это действие складывается из множества факторов. Одним из факторов, упомянутых в начале, является продуцирование новых ферментов в больших количествах в ответ на присутствие патогенов [4]. Использование ферментов в качестве антибактериальных препаратов может быть перспективным направлением борьбы с патогенами с множественной устойчивостью к антибиотикам. Поэтому стоит подробнее рассмотреть эти ферменты. В данной работе, в частности, далее рассматривается рибонуклеозидгидролаза С (RihC) из *L. reuteri*.

2.2. Общие физиологические свойства ферментов семейства Rih

Рибонуклеозидгидролазы (Rih) (К.Ф. 3.2.2.1-3.2.2.3, 3.2.2.7, 3.2.2.8) – это семейство ферментов, которое объединяет способность гидролизовать рибонуклеозиды по N-гликозидной связи до рибозы и соответствующего азотистого основания (рис. 2 и 3).

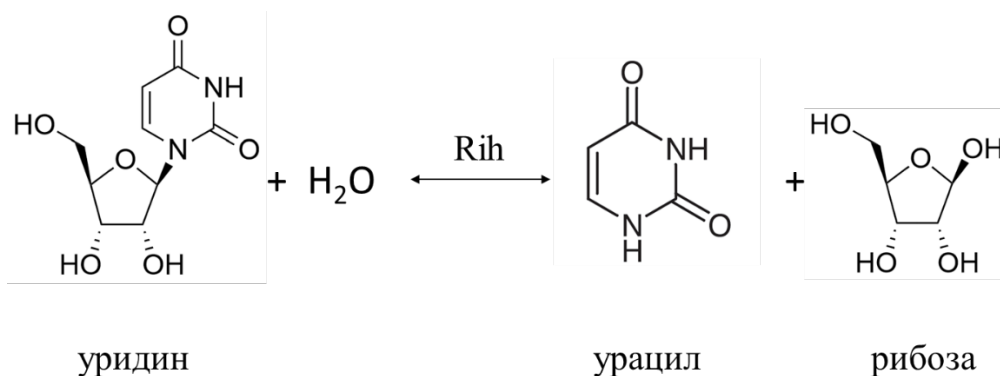


Рис.2. Реакция расщепления уридина пиримидиновыми и неспецифичными гидролазами Rih

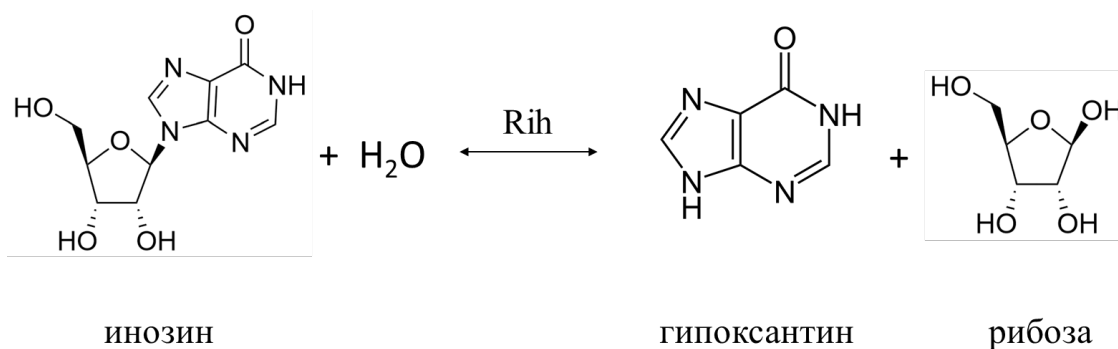


Рис.3. Реакция расщепления инозина пуриновыми и неспецифичными гидролазами Rih

Для простейших паразитов (например, *Trypanosoma brucei brucei*, *Leishmania major*, *Crithidia fasciculata*), роль этих ферментов в метаболизме ясна. Эти организмы не могут синтезировать азотистые основания *de novo*, они должны получать их другими способами. Для этого они получают извне рибонуклеозиды, которые дальше превращаются в азотистые основания либо с помощью фосфорилирования, либо с помощью гидролиза. Для осуществления второго процесса в их геноме присутствуют гены, кодирующие определённые гидролазы Rih, то есть для этих организмов такие гидролазы являются ключевым участником метаболизма [115–129].

Для бактерий физиологическая роль данных ферментов до конца не ясна. Бактерии имеют два общих метаболических пути получения пуринов и пиримидинов: синтез *de novo*, а также реутилизацию азотистых оснований и нуклеозидов. Примечательно то, что ни в синтезе *de novo*, ни в пути реутилизации не происходит простого синтеза нуклеозидов из азотистых оснований и рибозы, как можно было бы подумать. Вместо этого синтез нуклеозидов с нуля происходит в несколько этапов, и пуриновое или пиримидиновое основания синтезируются из нескольких молекул-предшественников [130]. В процессе реутилизации же большую роль играет фосфорилирование и связанные с этим процессом фосфорилазы [130]. Пуриновые и пиримидиновые нуклеозидфосфорилазы (пуриновые НФ, КФ 2.4.2.1; пиримидиновые НФ, КФ 2.4.2.2) играют ключевую роль в процессе реутилизации азотистых оснований [131,132]. Эти ферменты катализируют реакцию, показанную на рисунке 4.

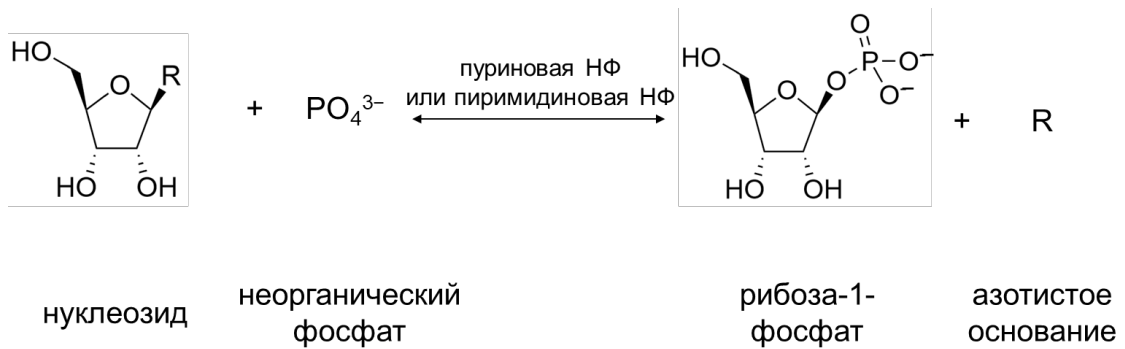


Рис.4. Реакция, катализируемая пуриновыми и пиримидиновыми НФ. R может быть как пуриновым, так и пиримидиновым азотистым основанием

Любопытно, что эти ферменты чаще используются в метаболических путях различных организмов, в сравнении с нуклеозидгидролазами, за исключением простейших. И хотя реакции, катализируемые гидролазами и фосфорилазами, различны, их роль для организмов одинакова – получение азотистого основания из нуклеозида. В соответствии с этим, рибонуклеозидгидролазы не играют ключевую роль в метаболизме азотистых оснований в бактериях, хотя и присутствуют в их геномах. Некоторым бактериям, образующим споры, например, *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, нуклеозидгидролазы нужны для предотвращения аденозин- или инозин-индуцированной споруляции путём расщепления соответствующих нуклеозидов [133–135].

Для растений нуклеозидгидролазы могут быть нужны в стрессовых условиях при недостатке азота, когда азотистые основания становятся его источником, для получения которых, соответственно, нужны гидролазы Rih. В нормальных условиях эти ферменты не играют ключевой роли. Эти гидролазы были обнаружены в разных растениях [136–140], при этом в некоторых растениях эти ферменты присутствуют в виде нескольких изоформ. Физиологическая роль гидролаз Rih в растениях не ограничивается только расщеплением стандартных рибонуклеозидов. Уменьшение нуклеозидгидролазной активности в *Physcomitrella patens* приводит к запоздалому формированию почек, что предполагает вовлечённость гидролаз Rih в метаболизм цитокининов [136].

В случае других эукариот нуклеозидгидролазы были найдены в дрожжах [141], грибах [142–147], нематодах [148,149], насекомых [150], рыбах [151]. Помимо этого, гены, гомологичные различным гидролазам Rih, были найдены и в других эукариотах, но ферменты, кодируемые этими генами, не были изучены. В млекопитающих гены гидролаз Rih на данный момент вообще не обнаружены. Нуклеозидгидролаза из комаров *Aedes aegypti*, являющихся переносчиком вируса лихорадки Денге, вводится в организм в месте укуса комара, разрушает циркулирующий аденозин, предотвращая тем самым активацию

мастоцитов через пуринергическую передачу сигнала и выступая таким образом местным анестетиком. Дрожжам *Saccharomyces cerevisiae* нуклеозидгидролаза нужна для участия в метаболизме пиридиннуклеозидникотинамидрибозида, предшественника NAD^+ [152]. Нуклеозидгидролазная активность в этом случае способствует активации сиртуинов, которые важны для продления жизни дрожжевых клеток. В других эукариотических организмах роль гидролаз Rih остаётся до конца не ясной.

Следует отдельно отметить ещё два типа гидролаз Rih. Это 1-метиладенозиннуклеозидаза (1-methyladenosine nucleosidase, КФ 3.2.2.13) и N-метилнуклеозидаза (N-methyl nucleosidase, 7-methylxanthosine nucleosidase, N-MeNase, КФ 3.2.2.25). Реакции, катализируемые этими ферментами, представлены на рисунках 5 и 6 соответственно. Любопытным фактом является то, что обе эти гидролазы способны катализировать только реакции со своими специфическими нуклеозидами и не способны расщеплять другие пурины и пиримидины [153–157]. 1-метиладенозиннуклеозидаза к настоящему моменту была найдена только в морских звёздах [153,154,158]. Этот фермент катализирует получение 1-метиладенина, который отвечает за индуцирование созревания ооцитов, и может быть найден в яичниках морских звёзд. N-метилнуклеозидаза была найдена в чайных и кофейных растениях [155–157]. Этот фермент катализирует производство 7-метилксантина в этих растениях, который затем превращается в теобромин и кофеин. Таким образом, эти две нуклеозидгидролазы тоже играют важную роль в метаболизме некоторых организмов.

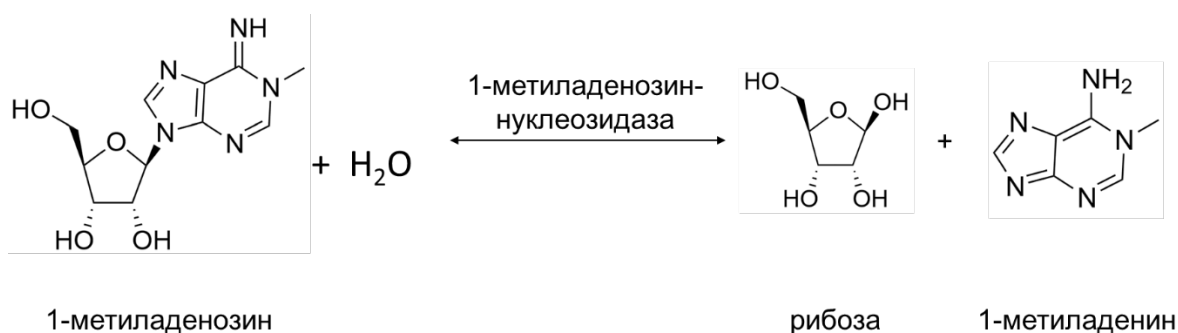


Рис.5. Реакция, катализируемая 1-метиладенозиннуклеозидазой

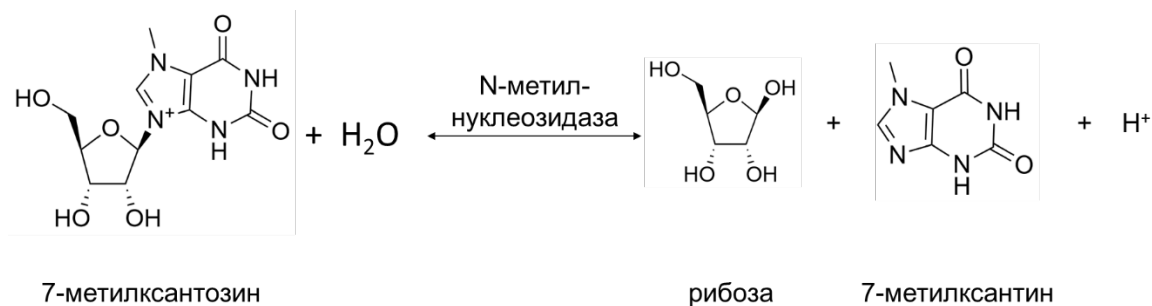


Рис.6. Реакция, катализируемая N-метилнуклеозидазой

Из вышесказанного можно заключить, что для некоторых организмов гидролазы Rih не являются ключевыми в метаболизме, тогда как для других они играют одну из ключевых ролей в нормальной жизнедеятельности или в условиях стресса.

По своей субстратной специфичности эти гидролазы можно подразделить на три категории: пиримидин-специфичные, пурин-специфичные и неспецифичные (рис. 7) (за исключением вышеупомянутых 1-метиладенозиннуклеозидазы и N-метилнуклеозидазы, которые являются высокоспецифичными к своим субстратам, хотя обе можно было бы классифицировать как пуриновые). Пиримидиновые гидролазы специфичны к рибонуклеозидам, имеющим в своём составе пиримидиновое азотистое основание (урацил, цитозин). В настоящий момент гидролазы такого типа именуют RihA и RihB (альтернативные названия: пиримидин-специфичная гидролаза, CU-NH, цитидин-уридин-предпочитающая нуклеозидгидролаза, YbeK – для гидролазы RihA, YeiK – для гидролазы RihB), открытые в *E. coli* и впервые названные так исследователями в работе [5]. Пример реакции, катализируемой данным типом гидролаз, представлен на рисунке 2. Гидролазы данного типа обнаружены преимущественно у бактерий [5,159–162]. Гидролазы второго типа специфичны к рибонуклеозидам с пуриновыми азотистыми основаниями (аденин, гуанин, ксантин, гипоксантин). Эти гидролазы можно, в свою очередь, подразделить на две категории: специфичные ко всем пуриновым основаниям (сокращённо называются IAG-NH, т.е. инозин-аденозин-гуанозин-предпочитающие нуклеозидгидролазы) или специфичные к 6-оксопуриновым основаниям (сокращённо называются IG-NH, т.е. инозин-гуанозин-предпочитающие нуклеозидгидролазы). Пример реакции для данного типа гидролаз представлен на рисунке 3. Гидролазы данного типа обнаружены у архей [163–166], простейших [116,119,127–129], некоторых бактерий [133], грибов [143,147], насекомых [150]. Гидролазы третьего типа являются неспецифическими пурин-пиримидиновыми гидролазами. Альтернативные названия также включают в себя RihC, IU-NH, инозин-уридин-предпочитающая нуклеозидгидролаза, YaaF. Данные гидролазы могут катализировать расщепление как пуриновых, так и пиримидиновых рибонуклеозидов,

предпочтительнее всего эти гидролазы вступают в реакцию с уридином и инозином, однако другие нуклеозиды также гидролизуются с определённой скоростью и специфичностью. Примеры реакций представлены на рисунках 2 и 3. Гидролазы данного типа имеют наиболее широкое распространение. Они часто встречаются у бактерий [4–6,134,148,167–178], растений [136–140,179], дрожжей [141,152] и микроскопических грибов [142,145,146], животных [148,149,151] и даже у некоторых простейших и архей [166].

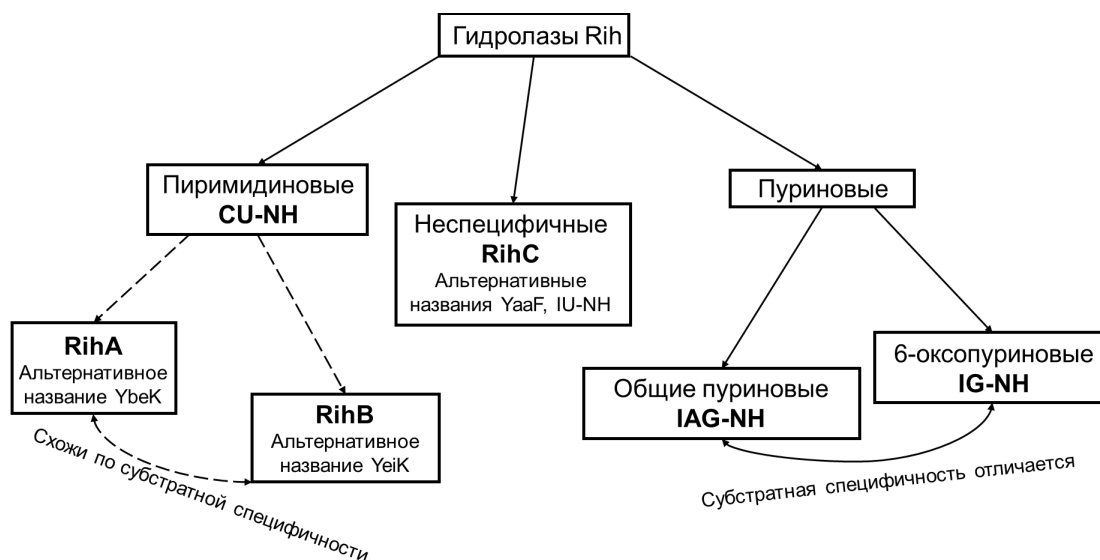


Рис.7. Типы гидролаз Rih

2.3. Структура рибонуклеозидгидролаз

2.3.1. Аминокислотные последовательности Rih

Широкую распространённость какого-либо фермента и широкую субстратную специфичность обычно можно объяснить различиями в структуре. Иногда замена всего одного аминокислотного остатка в каталитическом центре может привести к резкому изменению свойств фермента. В связи с этим важно рассмотреть структуру разных гидролаз Rih, чтобы объяснить различия в субстратной специфичности и такое широкое разнообразие организмов, содержащих гены этих гидролаз.

Для оценки эволюционного родства различных гидролаз Rih было построено филогенетическое дерево с помощью алгоритма MUSCLE [180], обработанное в программе Geneious Prime [181], представленное на рисунке 8. Данные об организмах и конкретных гидролазах, а также коды NCBI reference sequence представлены в таблице 3. Всего было выбрано 88 последовательностей гидролаз из разных организмов. Из близкородственных последовательностей, например, из последовательностей одной и той же гидролазы из

Тип организма	Организм	Тип гидролазы	Краткое название	Код NCBI
Бактерии	<i>Intrasporangium chromatireducens</i>	RihC	IchRihC	WP_034716916.1
Бактерии	<i>Nitrospira sp.</i> OLB3	RihC	NitRihC	KXK05231.1
Бактерии	<i>Chloroflexi bacterium</i> OLB14	RihC	ChlRihC	KXK12577.1
Бактерии	<i>Bacillus safensis</i>	RihC	BsaRihC	WP_061110295.1
Бактерии	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RihC	PaeRihC	WP_061189914.1
Бактерии	<i>Brucella anthropi</i>	RihC	BanRihC	WP_061347523.1
Бактерии	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	RihC	LreRihC	MBU5982057.1
Бактерии	<i>Microbacterium resistens</i>	*	MreRih	WP_067247535.1
Бактерии	<i>Nocardiopsis listeri</i>	RihC	NliRihC	WP_067600215.1
Бактерии	<i>Periweissella cryptocerci</i>	RihC	PerRihC	WP_133363136.1
Бактерии	<i>Weissella uvarum</i>	RihC	WuvRihC	WP_205144808.1
Бактерии	<i>Leuconostoc palmae</i>	RihC	LpaRihC	WP_220742199.1
Бактерии	<i>Oceanobacillus salinisoli</i>	RihC	OsaRihC	WP_156290634.1
Бактерии	<i>Oenococcus sicerae</i>	RihC	OsiRihC	WP_128686110.1
Бактерии	<i>Glycomyces fuscus</i>	RihC	GfuRihC	WP_097633998.1
Бактерии	<i>Bacillus thuringiensis</i>	IAG-NH	BthIAGNH	ABU48602.1
Бактерии	<i>Escherichia coli</i>	RihB	EcoRihB	B6I8L3.1
Бактерии	<i>Citrobacter koseri</i>	RihA	CkoRihA	A8AJF8.1
Бактерии	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RihC	KpnRihC	A6T4G4.1
Бактерии	Метагеномная библиотека	RihC	RK9NH	AYV61512.1
Бактерии	<i>Salmonella enterica</i>	RihC	SenRihC	APQ66417.1
Бактерии	<i>Ochrobactrum quorumnocens</i>	RihC	OquRihC	WP_095444951.1
Бактерии	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	RihC	LbuRihC	AEB72406.1
Бактерии	<i>Xanthomonas campestris</i>	IAG-NH	XcaIAGNH	UAU33856.1
Бактерии	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RihA	KpnRihA	CDQ54287.1
Бактерии	<i>Escherichia coli</i>	RihA	EcoRihA	CAD6019387.1
Бактерии	<i>Serratia marcescens</i>	RihA	SmaRihA	OUI66314.1
Бактерии	<i>Salmonella enterica</i>	RihA	SenRihA	CAH2854758.1

Тип организма	Организм	Тип гидролазы	Краткое название	Код NCBI
Бактерии	<i>Shewanella hafniensis</i>	RihA	ShaRihA	CAD6364937.1
Бактерии	<i>Enterobacter asburiae</i>	RihA	EasRihA	WP_163330465.1
Бактерии	<i>Aeromonas jandaei</i>	RihA	AjaRihA	WP_156852166.1
Бактерии	<i>Klebsiella spallanzanii</i>	RihB	KspRihB	VUS89946.1
Бактерии	<i>Rhodococcus opacus</i>	RihB	RopRihB	CAG7622013.1
Бактерии	<i>Bacillus altitudinis</i>	RihB	BalRihB	CAI7725891.1
Бактерии	<i>Staphylococcus aureus</i>	RihB	SauRihB	CAG9964796.1
Бактерии	<i>Pseudomonas sp. MM227</i>	RihB	PseRihB	CAI3787937.1
Бактерии	<i>Staphylococcus hominis</i>	IAG-NH	ShoIAGNH	SUM69402.1
Бактерии	<i>Streptococcus agalactiae</i>	IAG-NH	SagIAGNH	CCO74302.1
Бактерии	<i>Bacillus cereus</i>	IAG-NH	BceIAGNH	AFQ09851.1
Бактерии	<i>Anatolimnocola aggregata</i>	*	AagRih	WP_202921648.1
Бактерии	<i>Escherichia coli</i>	RihC	EcoRihC	CAD6022375.1
Грибы	<i>Daldinia sp.</i>	*	DalRih	KAI8965458.1
Грибы	<i>Hypoxyton rubiginosum</i>	*	HruRih	KAI6091274.1
Грибы	<i>Annulohypoxyton bovei</i>	*	AboRih	KAI2472106.1
Грибы	<i>Poronia punctata</i>	*	PpuRih	KAI1816947.1
Грибы	<i>Daldinia bambusicola</i>	*	DbalRih	KAI1807258.1
Грибы	<i>Biscogniauxia marginata</i>	*	BmaRih	KAI1498832.1
Грибы	<i>Whalleya microplaca</i>	*	WmiRih	KAI1077167.1
Грибы	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	*	PliRih	PWI74805.1
Дрожжи	<i>Cyberlindnera jadinii</i>	RihA	CjaRihA	CEP20255.1
Дрожжи	<i>Nakaseomyces glabratus</i>	RihC	NgIRihC	KAN7604059.1
Дрожжи	<i>Suhyomyces tanzawaensis</i>	RihC	StaRihC	XP_020067128.1
Дрожжи	<i>Candida parapsilosis</i>	RihC	CpaRihC	KAF6065839.1
Дрожжи	<i>Yamadazyma tenuis</i>	*	YteRih	EGV65217.1
Пресмыкающиеся	<i>Platysternon megacephalum</i>	*	PmeRih	TFJ96048.1
Паукообразные	<i>Sarcoptes scabiei</i>	*	SscRih	UXI17525.1

Тип организма	Организм	Тип гидролазы	Краткое название	Код NCBI
Лучепёрые рыбы	<i>Anoplocoma fimbria</i>	*	AfiRih	XP_054471125.1
Лучепёрые рыбы	<i>Dunckerocampus dactyliophorus</i>	*	DdaRih	XP_054644538.1
Головоногие	<i>Octopus bimaculoides</i>	RihC	ObiRihC	XP_014774668.1
Насекомые	<i>Aethina tumida</i>	RihC	AtuRihC	XP_019871744.1
Лучепёрые рыбы	<i>Nibea albiflora</i>	RihC	NaIRihC	KAG8004511.1
Лучепёрые рыбы	<i>Nothobranchius furzeri</i>	RihC	NfuRihC	XP_015807835.1
Лучепёрые рыбы	<i>Pimephales promelas</i>	RihC	PprRihC	KAG1945547.1
Насекомые	<i>Anastrepha obliqua</i>	RihC	AobRihC	XP_054728927.1
Простейшие	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	IG-NH	TbrIGNH	XP_846080.1
Простейшие	<i>Trypanosoma vivax</i>	IAG-NH	TviIAGNH	AAG38561.2
Простейшие	<i>Trypanosoma cruzi</i>	IAG-NH	TcrIAGNH	EAN96320.1
Простейшие	<i>Trypanosoma congolense</i>	IAG-NH	TcoIAGNH	AAG38560.1
Простейшие	<i>Leishmania donovani</i>	RihC	LdoRihC	AAG02281.1
Простейшие	<i>Leishmania donovani</i>	IG-NH	LdoIGNH	AYU77254.1
Простейшие	<i>Symbiodinium sp.</i>	RihA	SymRihA	CAE7031721.1
Простейшие	<i>Symbiodinium pilosum</i>	RihB	SpiRihB	CAE7496820.1
Двудольные	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RihC	AthRihC1	AED92622.1
Двудольные	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RihC	AthRihC2	AED92625.1
Двудольные	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RihC	AthRihC3	AED92623.1
Однодольные	<i>Zea mays</i>	RihA	MaysRihA	NP_001105259.2
Листостебельные мхи	<i>Physcomitrella patens</i>	RihC	PpaRihC1	AFZ84928.1
Листостебельные мхи	<i>Physcomitrella patens</i>	RihC	PpaRihC2	AFR46616.1
Листостебельные мхи	<i>Physcomitrella patens</i>	RihC	PpaRihC3	AFZ84924.1
Однодольные	<i>Zea mays</i>	RihC	MaysRihC	AFD54993.1
Хлорофициевые	<i>Dunaliella salina</i>	RihC	DsaRihC	KAF5829699.1

На филогенетическом дереве (рис. 8) и в таблице 3 различными цветами отмечены гидролазы из различных организмов. Оранжевым отмечены гидролазы из архей, синим – из бактерий, фиолетовым – из многоклеточных грибов, розовым – из дрожжей, красным – из

многоклеточных животных, голубым – из простейших, зелёным – из растений. Некоторые гидролазы отмечены символом * в таблице, а в их названии не указан тип гидролазы. Это было обусловлено тем, что тип гидролазы не был определён для этих ферментов при выкладывании их в открытый доступ. Однако, из анализа филогенетического дерева и далее из выравнивания аминокислотных последовательностей можно предположить, что эти гидролазы должны относиться к неспецифическим RihC.

Анализируя данное филогенетическое дерево, можно увидеть, что гидролазы образуют несколько кластеров по организмам, в которых они обнаружены. Присутствует большой кластер бактериальных Rih, причём внутри этого кластера можно заметить отдельный небольшой кластер гидролаз RihA и отдельный небольшой кластер гидролаз RihC, в котором присутствуют некоторые гидролазы RihB. С точки зрения эволюционного развития это логично: в каких-то организмах требовались гидролазы, действующие только на пиримидиновые нуклеозиды, и все эти гидролазы RihA похожи между собой, в каких-то организмах гидролазы Rih эволюционно развились так, что не имели строгой специфичности к тому или иному типу нуклеозидов, имея вместо этого способность катализировать все реакции с нуклеозидами. Гидролазы RihB являются более интересным объектом для обсуждения. Несмотря на то, что наибольшую эффективность они проявляют в катализе пиримидиновых нуклеозидов, как и гидролазы RihA, из-за чего их объединяют вместе с гидролазами RihA в один подтип, было замечено [5], что гидролазы RihB также с очень небольшой скоростью могут катализировать реакции расщепления и некоторых пуриновых нуклеозидов. Это видно и из дерева: эволюционно они ближе расположены к гидролазам RihC, чем к гидролазам RihA. Касательно бактериальных Rih также стоит отметить, что среди них есть некоторые, расположенные вдали от основного бактериального кластера и находящиеся эволюционно ближе к другим типам организмов. Причина такого разнообразного развития бактериальных нуклеозидгидролаз остаётся неясной.

На филогенетическом дереве также отчётливо выражены небольшие кластеры по другим организмам: обособленный кластер животных гидролаз, кластер гидролаз архей, которые эволюционно близки к некоторым бактериальным гидролазам, два отдельных неродственных кластера дрожжевых и грибных гидролаз. Некоторые гидролазы из простейших оказались эволюционно близки гидролазам многоклеточных животных, тогда как другие оказались ближе к некоторым бактериальным. Наиболее интересно на эволюционном дереве расположены Rih из растений. Известно, что многие ферменты в растениях синтезируются в виде нескольких изоферментов, отличающихся по строению и

часто по свойствам. Это же наблюдается и для гидролаз из растений *Arabidopsis thaliana* и мха *Physcomitrella patens*, имеющих по три изофермента RihC. Примечательно то, что гидролазы этих растений находятся в разных кластерах и что эти кластеры эволюционно далеки друг от друга, по сравнению с другими гидролазами. Почему эволюция привела к такому сильному различию одного типа гидролаз в одном типе организмов, остаётся до конца не понятным. Вероятно, это может быть связано с разными предками данных типов растений и соответственно разными предшественниками гидролаз RihC. Помимо этого, можно заметить, что некоторые гидролазы выбиваются из своих основных кластеров и часто имеют удлинённые ветви на дереве. Длина ветвей говорит о среднем количестве замен аминокислотных остатков по сравнению с соседями, то есть, в целом, о близости первичной структуры конкретных гидролаз. Длинные ветви свидетельствуют о том, что хотя данная гидролаза близка к другой или другим ближайшим гидролазам (имеет один узел дерева с ними), она всё ещё значительно отличается от них своим аминокислотным составом (ветвь удлинена).

Для выбранных генов было построено три выравнивания аминокислотных последовательностей. Белки группировали по типу субстратной специфичности: пиримидиновые (RihA и RihB), пуриновые (IAG-NH и IG-NH) и неспецифические (RihC). Для сравнения выбирали все доступные организмы для каждого типа белка. Выравнивания представлены на рисунках 9-12. Выравнивания проводили с помощью алгоритма MUSCLE [180], визуализацию проводили в программе Geneious Prime [181]. В качестве матрицы совпадений использовали Blosum62. Цветом на каждом из выравниваний отмечены аминокислотные остатки, имеющие определённый процент совпадения: зелёным – $\geq 90\%$ совпадения, жёлтым – 80-90%, оранжевым – 60-80%. Вся нумерация аминокислотных остатков в тексте идёт в соответствии с каждым приведённым выравниванием и не обязательно отображает реальное положение конкретного остатка в конкретной гидролазе.

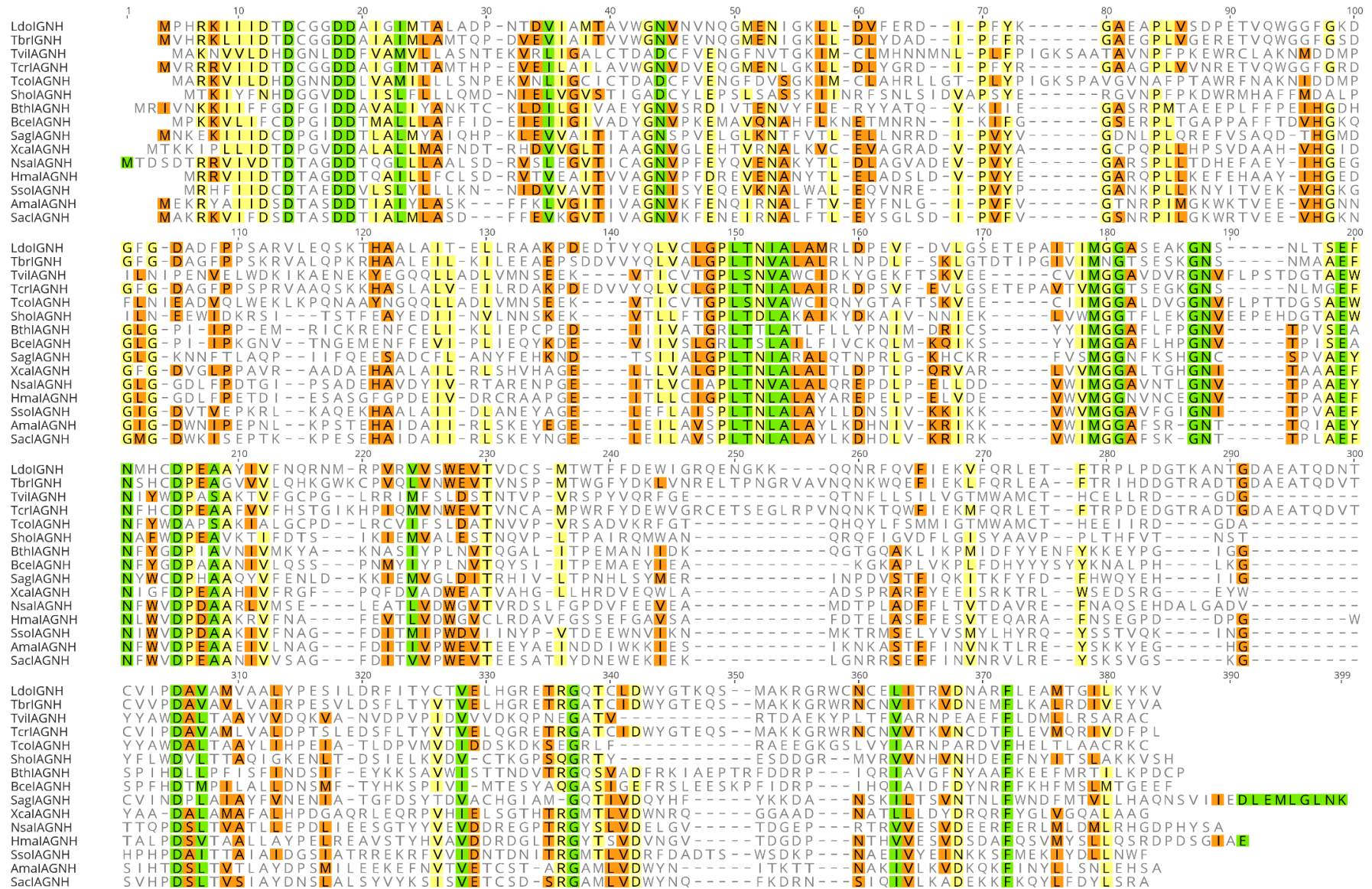


Рис.9. Аминокислотное выравнивание пуриновых гидролаз Rih из разных источников. Цветами отмечены остатки с определённым процентом совпадения: зелёным – $\geq 90\%$ совпадения, жёлтым – 80-90%, оранжевым – 60-80%.

Пуриновые гидролазы IAG-NH и IG-NH были обнаружены в простейших, археях и некоторых бактериях. На рисунке 9 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей некоторых таких гидролаз. Видно, что на N-конце этих ферментов присутствует строго консервативная последовательность DXDXXXDD в районе 10-20 позиции, которая ответственна за связывание кальция и рибозы. Связыванию кальция также способствуют остатки D в положениях 205 и 305, а в связывании рибозильного кольца участвуют консервативные остатки GN в районе 190 и EXN в районе 200 положений [117,127,182,183]. Связывание иона кальция и кольца рибозы является универсальным свойством всех рибонуклеозидгидролаз. Поэтому аминокислотные остатки, отвечающие за эти функции, являются высококонсервативными, причём это касается всех гидролаз Rih в принципе. Как будет видно дальше, со связыванием азотистого основания и, соответственно, определением аминокислотных остатков, обуславливающих субстратную специфичность, всё значительно сложнее. В работах [127] и [183] высказано предположение, что остатки W83 и W260 отвечают за связывание пуринового кольца нуклеозидов, объясняя это π -стэкинговыми взаимодействиями. Однако в работе [117], посвящённой 6-оксопуриновой гидролазе, отмечают, что остатки триптофана в этих структурно эквивалентных положениях отсутствуют, хотя фермент специфичен к инозину и гуанозину. В работе [182] также отмечено, что эти остатки триптофана не сохраняются, причём в этой работе уже исследуют не 6-оксопуриновую гидролазу, а IAG-NH. Кроме этого, из выравнивания также видно, что хотя во многих пуриновых гидролазах присутствуют полуконсервативные остатки Phe, Tug и Tgr (например, около позиций 200, 204, 227), положения, рассмотренные в работе [127] и обозначенные как связывающие кольцо азотистого основания, не являются консервативными. Возможно, в связывании пуринов действительно участвуют остатки Tgr, Tug или Phe, находящиеся, однако, в других положениях, или же, возможно, даже внутри этой небольшой группы гидролаз для каждой может быть характерен свой вид связывания и стабилизации пуринового кольца рибонуклеозида. Главными особенностями активного центра в таком случае являются остатки Asp, помогающие связывать кальций и рибозу, остатки Asn, также участвующие в связывании рибозы, и гидрофобный карман, в котором должно находиться пуриновое основание (возможно, консервативная последовательность L(T/S)XXA в области 150 положения участвует в образовании такого кармана, поскольку таковая образована преимущественно гидрофобных аминокислотных остатков и не имеет строгой описанной функции в катализе).

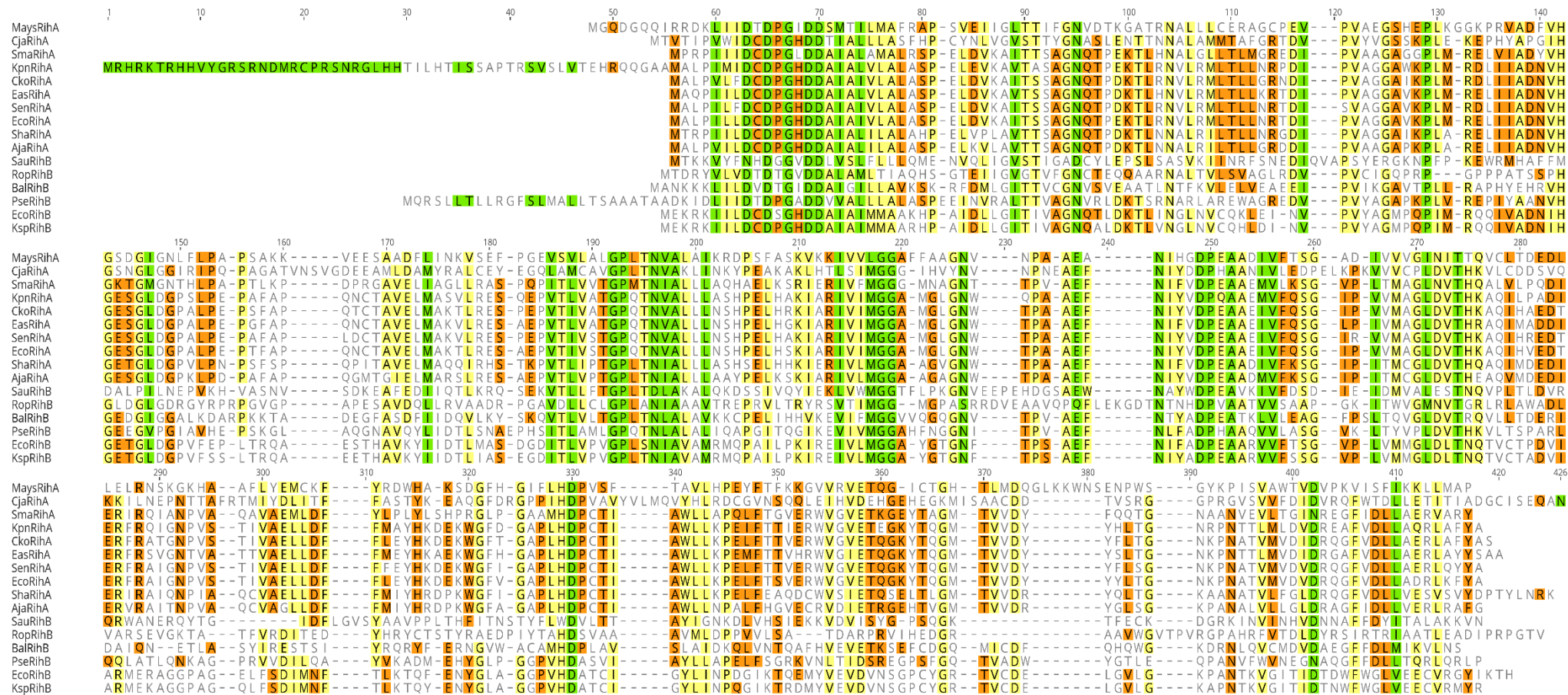


Рис.10. Аминокислотное выравнивание пиримидиновых гидролаз Rih из разных источников. Цветами отмечены остатки с определённым процентом совпадения: зелёным – $\geq 90\%$ совпадения, жёлтым – 80-90%, оранжевым – 60-80%.

Пиримидиновые гидролазы RihA и RihB обнаружены преимущественно в бактериях, хотя данные виды рибонуклеозидгидролаз также найдены и в некоторых других организмах, например, растениях и простейших. На рисунке 10 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей некоторых представителей этих гидролаз. Как и в случае с пуриновыми гидролазами, данные гидролазы имеют на N-конце высококонсервативную последовательность DXDXGXDD, необходимую для связывания иона кальция и стабилизации рибозы, входящей в состав нуклеозидов [163]. Несмотря на то, что для выравнивания были выбраны не только бактериальные RihA и RihB, но ещё и ферменты из растений и дрожжей, можно заметить, что аминокислотные последовательности всех представленных ферментов содержат большое количество высоко- и полуконсервативных участков. Это может быть связано со схожестью субстратов – уридина и цитидина – а также с их небольшим количеством. Можно предположить, что катализ идёт практически одинаково независимо от источника данного типа фермента. Предположительно, высококонсервативные остатки Asp и Asn нужны как для связывания кальция, так и для связывания рибозы и стабилизации переходного состояния во время катализа. Остатки гидрофобных аминокислот, которые в этих ферментах являются как консервативными, так и полуконсервативными, необходимы для образования гидрофобного кармана в активном центре фермента. Среди этих остатков присутствуют Leu, Ile, Val, Ala. В работе [163] авторы указывают, что в связывании пиримидинового кольца RihB (а, соответственно, можно то же самое предположить и про RihA ввиду высокой схожести этих типов гидролаз) участвуют аминокислоты Asn(Val/Ile)His в районе 140 положения, Phe в 238 положении, в Phe/Tyr 311 положении, His в 315 положении, Tyr/Trp в 320 и His в 329 положениях. Эти остатки действительно являются консервативными или полуконсервативными в RihA и RihB независимо от источника фермента и могут помогать в связывании азотистого основания, которое является наиболее гидрофобной частью нуклеозида.

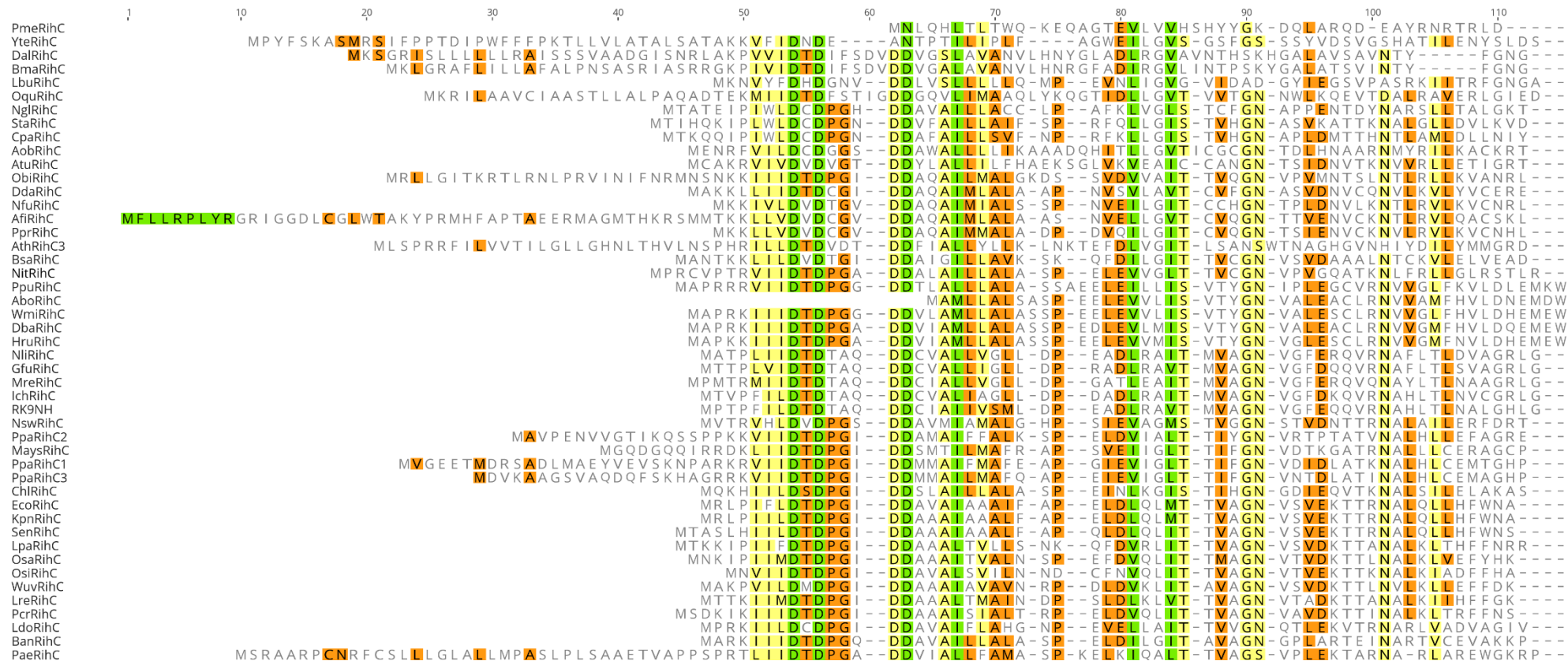


Рис.11. Фрагмент аминокислотного выравнивания вблизи N-конца неспецифичных гидролаз Rih из разных источников. Цветами отмечены остатки с определённым процентом совпадения: зелёным – $\geq 90\%$ совпадения, жёлтым – 80-90%, оранжевым – 60-80%.



Рис.12. Фрагмент аминокислотного выравнивания вблизи центра связывания неспецифичных гидролаз Rih из разных источников. Цветами отмечены остатки с определённым процентом совпадения: жёлтым – 80-90% совпадения, оранжевым – 60-80%.

Неспецифические гидролазы RihC имеют самый широкий спектр распространённости из всех типов гидролаз Rih. Эти гидролазы были найдены в самых различных организмах, начиная от бактерий и заканчивая многоклеточными животными. На рисунках 11 и 12 представлены два фрагмента выравнивания аминокислотных последовательностей RihC широкого набора источников с целью изучить, что объединяет гидролазы данного типа между собой, и что является особенным только для определённых организмов. Для данного типа гидролаз, как и в предыдущих двух случаях, наблюдается наличие высококонсервативной области DXDXXXDD в области N-конца (для некоторых грибных гидролаз эта область представлена в виде DXDXXXXXDD), необходимой для связывания иона кальция и 2'-ОН-группы кольца рибозы. В целом, в этих гидролазах тоже присутствуют аминокислотные остатки Asp и Asn, помогающие в связывании рибозы и кальция, расположенные вдоль аминокислотных последовательностей, и гидрофобные области, образующиеся благодаря консервативным и полуконсервативным аминокислотным остаткам. Определить в RihC ключевые остатки, помогающие стабилизировать азотистые основания, труднее. В работе [175] предлагают остатки His и Tyr в 404 и 405 положениях и His в 428 положении как ключевые для стабилизации пуриновых оснований в RihC из *E. coli*. При этом в работе [184] для RihC в качестве ключевых остатков, связывающих пуриновое кольцо, предложены Tyr400, Tyr405 и His428. Эта же каталитическая триада была предложена и для механизма катализа пиримидиновых нуклеозидов (для стабилизации пиримидиновых оснований). Однако если обратить внимание на выравнивание, то хорошо видно, что эти остатки не являются консервативными. Для некоторых RihC действительно наблюдается сохранение второго остатка тирозина из этой триады, а остаток гистидина является высококонсервативным для всех RihC, кроме грибных. Следует отметить, что первый остаток триады не имеет строго определённого положения в аминокислотной последовательности гидролаз этого типа и в принципе может не быть строго консервативным остатком His или Tyr. Тем не менее, было показано [118,123,125,175,184], что эти аминокислотные остатки необходимы для катализа. Возможно, низкую консервативность в их положении можно объяснить разницей в строении этих гидролаз в зависимости от организма. Эволюционно так сложилось, что эти остатки «мигрировали» вдоль аминокислотной последовательности в ту или другую сторону в зависимости от организма. Более того, субстратная специфичность гидролаз RihC, хотя в целом похожа (могут гидролизовать и пуриновые, и пиримидиновые рибонуклеозиды), всё же отличается в зависимости от организма, что может быть связано именно с положением этой триады и, в свою очередь, может быть объяснено тем, в каком конкретном организме данная

гидролаза RihC содержится, какие у этого организма в ходе эволюции сформировались потребности применительно к азотистым основаниям и нуклеозидам.

2.3.2. Пространственная структура Rih

К настоящему моменту получен ряд пространственных структур ферментов класса Rih разных типов. Исследователям удалось получить кристаллы рекомбинантных рибонуклеозидгидролаз из разных организмов: известны структуры ферментов из бактерий, архей, простейших и даже многоклеточных растений и животных. В таблице 4 ниже приведены коды PDB, соответствующие структурам гидролаз. Оранжевым цветом выделены ферменты из архей, синим – из бактерий, красным выделен фермент из нематод, относящимся к многоклеточным животным, голубым – из простейших эукариот, зелёным – из многоклеточных растений. В таблице представлены только уникальные структуры. Не представлены структуры одного и того же фермента с разными ингибиторами/лигандами и не представлены структуры некоторых мутантных форм ферментов, для которых есть структуры ферментов дикого типа.

Таблица 4. Разрешённые пространственные структуры гидролаз Rih, депонированные в базу данных PDB

Организм	Фермент	Код PDB
<i>Saccharolobus solfataricus</i>	IAG-NH	3T8I
<i>Saccharolobus solfataricus</i>	RihB	3T8J
<i>Escherichia coli</i>	RihA	1YOE
<i>Escherichia coli</i> K-12	RihA	3G5I
<i>Shewanella loihica</i> PV-4	RihA	4WR2
<i>Escherichia coli</i>	RihB	1Q8F
<i>Escherichia coli</i> K-12	RihB	3B9X
<i>Escherichia coli</i> K-12	RihB	3MKM
<i>Gardnerella vaginalis</i> 315-A	RihB	6BA0
<i>Bacillus anthracis</i>	RihC	2C40
<i>Gardnerella vaginalis</i> 315-A	RihC	6BA1
<i>Caenorhabditis elegans</i>	IAG-NH	5MJ7
<i>Trichomonas vaginalis</i>	IAG-NH	8DB8
<i>Trypanosoma brucei</i>	IAG-NH	4I73
<i>Trypanosoma vivax</i>	IAG-NH	1HOZ
<i>Trypanosoma brucei</i>	IG-NH	3FZ0
<i>Crithidia fasciculata</i>	RihC	1MAS
<i>Leishmania braziliensis</i>	RihC	5TSQ
<i>Leishmania major</i>	RihC	1EZR
<i>Zea mays</i>	RihA	6ZK1
<i>Physcomitrella patens</i>	RihC	4KPN
<i>Zea mays</i>	RihC	4KPO

Примеры пространственных структур представлены на рисунке 13. Видно, что гидролазы Rih могут быть тетрамером (рис. 13 А, В) или димером (рис. 13 Б), причём структуры могут быть как симметричными, так и несимметричными.

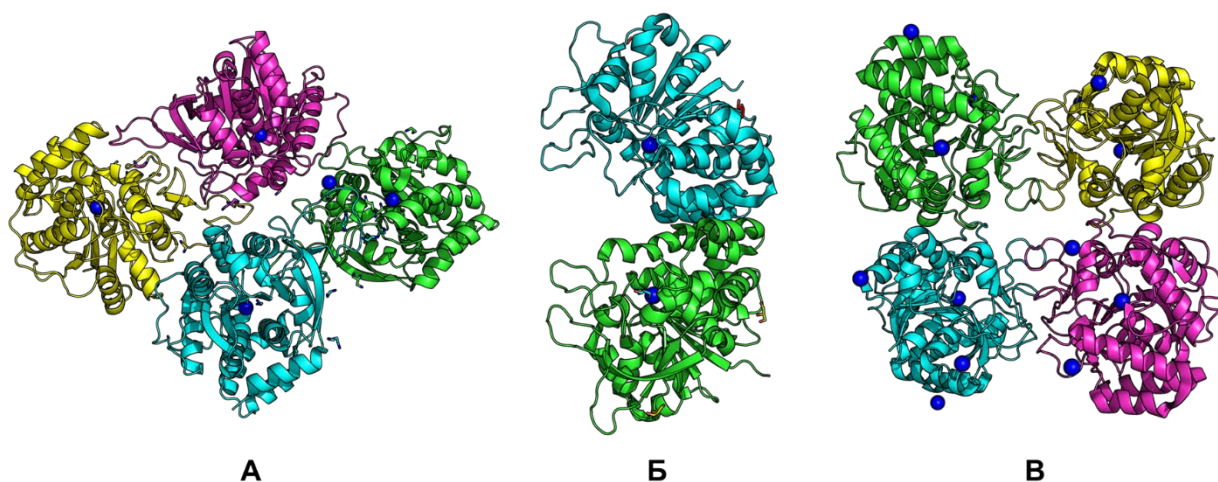


Рис.13. Пространственные структуры Rih. А – RihA из *Zea mays* (6ZK1), Б – IAG-NH из *Trypanosoma vivax* (1HOZ), В – RihB из *Gardnerella vaginalis* (6BA0). Ионы кальция обозначены синим цветом.

Все известные на данный момент пространственные структуры гидролаз Rih содержат один ион кальция на одну субъединицу. На рисунке 14 показаны фрагменты активного центра ферментов RihC из *Crithidia fasciculata* в комплексе с pAPIR (para-aminophenyliminoribitol; рисунок 14 А) и IAG-NH из *Trypanosoma vivax* в комплексе с инозином (рисунок 14 Б) [183]. На рисунке 14 А видно близкое расположение остатков гистидина и тирозина фермента RihC к азотистому основанию в нуклеозиде, что указывает на их значимость в связывании субстрата. Для фермента IAG-NH на рисунке 14 Б можно наблюдать близкое расположение двух остатков триптофана, которые, как было описано ранее, участвуют в π -стэкинге и таким образом стабилизируют азотистое основание нуклеозида. Для обоих ферментов видно наличие консервативных остатков Asp, Asn, Glu и Thr, участвующих в связывании иона кальция или кольца рибозы нуклеозида.

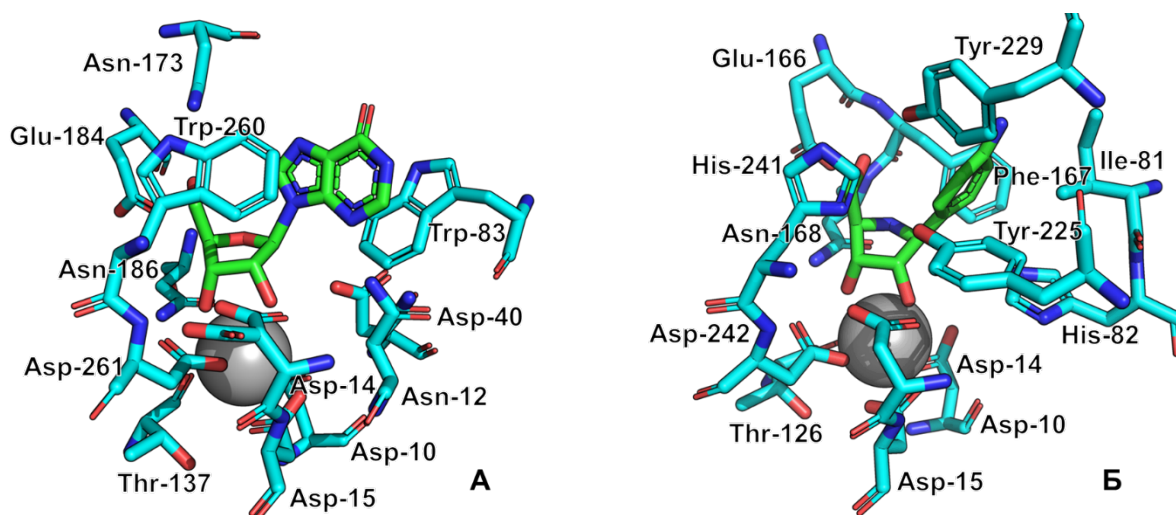


Рис.14. Фрагменты активного центра ферментов IAG-NH из *T. vivax* в комплексе с инозином (А, PDB ID: 1KIC) и RihC из *C. fasciculata* в комплексе с рAPIR (Б, PDB ID: 2MAS). Молекулы в комплексе с ферментом обозначены зелёным цветом, ион кальция – серой сферой. Ключевые остатки активного центра пронумерованы для каждого случая.

Механизм катализа для пуриновых гидролаз Rih отвечает в целом механизму нуклеофильного замещения SN1 с образованием иона оксокарбения в переходном состоянии [183]. В этом переходном состоянии N-гликозидная связь нуклеозида находится в почти разрушенном состоянии с расстоянием между атомами 2Å , тогда как атакующая молекула воды находится на расстоянии примерно 3Å . Изучение кинетических изотопных эффектов также показало, что протонирование N7 атома пуринового кольца нуклеозида предшествует появлению переходного состояния и приводит к дестабилизации N-гликозидной связи. На основании этого можно выделить три основных момента в гидролизе пуриновых нуклеозидов: стерическая и электростатическая стабилизация оксокарбениевого иона, активация нуклеофильной молекулы воды и активация уходящей группы.

Активация молекулы воды происходит за счёт нековалентного связывания её с ионом кальция в активном центре и оттягивания протона этой молекулы воды на себя остатком Asp.

При некаталитическом сольволизе нуклеозидов было обнаружено, что свободные OH-группы рибозы оказывают стабилизирующий эффект на N-гликозидную связь и препятствуют образованию положительно заряженного оксокарбениевого иона [185]. Для ферментативного катализа, однако, наличие свободных OH-групп крайне необходимо. Предположительно, переходное оксокарбениевое состояние значительно стабилизируется взаимодействиями металлофермента и рибозы двумя путями. Первый заключается в накоплении энергии связывания, которая используется для искривления конформации кольца

рибозы и приведения его в активированное состояние (стерический катализ). Второй заключается в поляризации некоторых гидроксильных групп с последующим появлением на них (частичных) отрицательных зарядов, которые стабилизируют образующийся положительный оксокарбениевый ион (электростатический катализ).

Как было отмечено ранее, появлению переходного состояния предшествует протонирование N7 атома пуринового кольца нуклеозида. В ходе этого процесса появляется хорошая уходящая группа, облегчающая разрушение N-гликозидной связи. Механизм такой стабилизации остаётся не до конца понятным, поскольку в ближайшем окружении азотистого основания в ферменте находятся аминокислотные остатки Trp, однако индольное кольцо остатка триптофана не может быть классической кислотой, активирующей N7 атом, поскольку это кольцо не ионизируется. Было выдвинуто предположение [129], что благодаря π -стэкингу повышается pK_a N7 атома азотистого основания, за счёт чего этот атом протонируется водой.

В случае катализа пиримидиновыми или неспецифическими гидролазами общий механизм аналогичен [183]. Поскольку во всех ферментах присутствует ион кальция и консервативные остатки аспарагиновой кислоты, активация нуклеофильной молекулы воды и стабилизация оксокарбениевого иона происходят аналогичным образом описанному выше. Сама активация уходящей группы также происходит за счёт протонирования N3 атома пиримидинового (аналогичен N7 атому пуринового) азотистого основания, однако в данном случае вблизи от кольца азотистого основания находятся остатки тирозина и гистидина, предположительно участвующие в протонировании и образовании хорошей уходящей группы. Предполагается, что для гидролаз RihC при катализе расщепления пиримидиновых нуклеозидов протонирование N3 атома происходит с помощью непосредственно остатка гистидина, а при катализе расщепления пуриновых нуклеозидов протонирование N7 атома происходит по цепи His-Tyr-Tyr. В то же время у пиримидиновых гидролаз RihA и RihB остатки тирозинов являются неконсервативными, поэтому данные гидролазы либо не могут катализировать расщепление пуриновых нуклеозидов вообще, либо могут, но на порядки хуже расщепления пиримидиновых нуклеозидов.

На основании структуры активного центра, а именно в зависимости от ключевых аминокислотных остатков, стабилизирующих азотистое основание нуклеозида, предложена классификация нуклеозидгидролаз Rih на три группы, не опирающихся на субстратную специфичность (рисунок 15). В группу I принято включать гидролазы, имеющие в своём активном центре остаток гистидина (а также сопряжённые с этим остатком остатки тирозина, участвующие в протонировании кольца азотистого основания), в группу II – гидролазы,

имеющие вместо этого остатка гистидина остаток триптофана (и сопряжённый с ним второй остаток триптофана на удалении, образующие π -стэкинговые взаимодействия с пуриновым кольцом), а в группу III – гидролазы, имеющие в этом положении остаток цистеина (который обычно также имеет парный остаток цистеина на удалении, тоже участвующий в катализе).

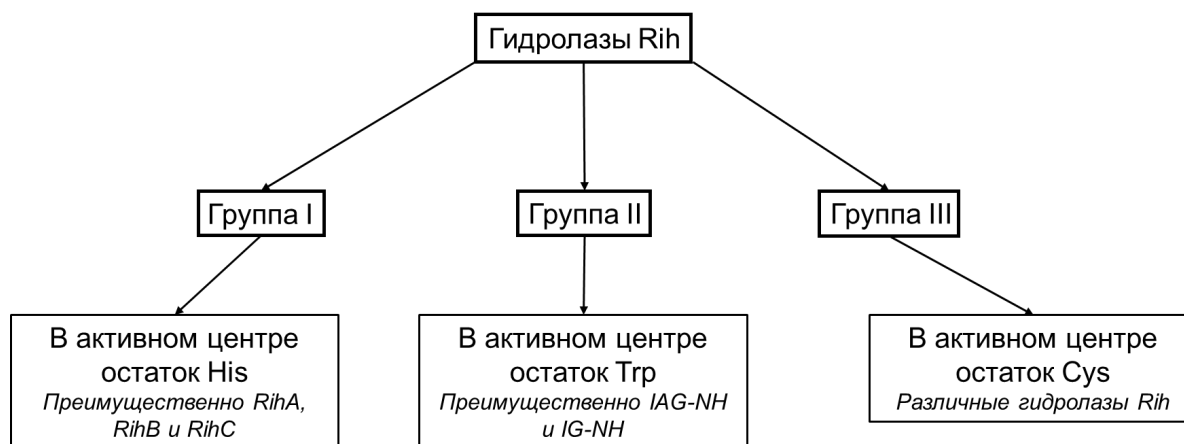


Рис.15. Схема разделения гидролаз Rih на три группы в зависимости от каталитически важных остатков в активном центре

Гидролазы первых двух групп являются на данный момент наиболее изученными и наиболее распространёнными. В этих двух группах также есть довольно чёткое разделение гидролаз по их субстратной специфичности. К третьей группе относятся гидролазы с разной предпочтительностью по субстратам. Несмотря на то, что остаток цистеина в активном центре больше похож по своим функциям на остаток гистидина группы I и что протонирование азотистого основания происходит схожим образом с гидролазами первой группы, в этой группе были обнаружены и пурин-специфические гидролазы (см, например, [149]).

Хотелось бы отметить, что данная классификация не может считаться окончательной, поскольку некоторые гидролазы Rih в этом каталитически важном положении не содержат ни один из описанных аминокислотных остатков, а содержат остаток пролина. Это можно увидеть на аминокислотных выравниваниях, описанных в предыдущем разделе, для некоторых гидролаз IAG-NH и RihC (рисунок 9 – положение 304 на выравнивании; рисунок 12 – положение 429 на выравнивании). При этом наличие остатка пролина в данном положении является не единичной мутацией, связанной с эволюционным развитием какого-то одного фермента, а наблюдается для некоторого количества гидролаз Rih как из бактерий, так и из архей. И если для гидролаз RihC из грибов, у которых присутствует остаток пролина в положении, связывающим азотистое кольцо, рядом с этим остатком пролина находится остаток гистидина, т.е. на катализ эти изменения, скорее всего, не влияют, то для пуриновых

гидролаз в непосредственной близости от этого остатка пролина нет ни остатка гистидина, ни остатка триптофана, которые должны связывать азотистое основание в активном центре. «Пролиновые» гидролазы на данный момент являются неизученными, поэтому объяснить точный механизм активации уходящей группы нельзя, однако мы предполагаем, что механизм схож с механизмом активации в группе II: остаток пролина повышает pK_a азотистого основания и облегчает протонирование азота водой, что создаёт хорошую уходящую группу. Однако для точного установления механизма катализа данными гидролазами необходимы эксперименты по анализу кинетических данных и структуры.

2.4. Каталитические свойства гидролаз Rih

Разные типы нуклеозидгидролаз обладают разной субстратной специфичностью. Разнятся и каталитические параметры в зависимости от типа гидролазы и организма, из которого она выделена. В целом, почти все изученные на данный момент гидролазы Rih имеют оптимум каталитической активности при pH 7,0-7,5 и температуре 25-37°C. Исключением являются гидролазы из термофильных архей *Sulfolobus solfataricus* (температурный оптимум работы фермента составил 80°C), бактерий *Lactobacillus buchneri* LBK78, *Agromyces sp.* MM-1 (температурный оптимум работы фермента составил 50°C).

Каталитические параметры для всех изученных на данный момент гидролаз Rih в реакциях с основными рибонуклеозидами представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. Кинетические параметры гидролаз Rih в реакции с аденозином, гуанозином, цитидином и уридином. * – в качестве субстрата использовали не уридин, а 2'-О-метилуридин. Символ «-» означает отсутствие активности, н.д. – нет данных.

Организм	Тип гидролазы	$k_{cat}^{\text{уридин}},$ с ⁻¹	$K_M^{\text{уридин}},$ μМ	$k_{cat}^{\text{цитидин}},$ с ⁻¹	$K_M^{\text{цитидин}},$ μМ	$k_{cat}^{\text{гуанозин}},$ с ⁻¹	$K_M^{\text{гуанозин}},$ μМ	$k_{cat}^{\text{аденозин}},$ с ⁻¹	$K_M^{\text{аденозин}},$ μМ	Источник
<i>Trypanosoma vivax</i>	IAG-NH	н.д.	н.д.	0,338±0,005	925±39	2,3±0,1	2,3±0,5	2,6±0,2	8±2	[127]
<i>Trypanosoma vivax</i>	IAG-NH	0,022±0,002	586±150	0,338±0,005	925±39	1,9	3,82	1,46±0,06	8,54±1,29	[128]
<i>Trypanosoma cruzi</i>	IAG-NH	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	13±2	н.д.	н.д.	[115]
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	IAG-NH	0,060±0,002	3950±500	-	-	29,1±0,9	160±16	3,8±0,1	60±8	[165,182]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	IAG-NH	0,0022±0,0002	2843±813	0,50±0,03	10004±320	0,84±0,09	164±56	0,78±0,05	93±16	[148]
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	IG-NH	0,0038±0,0008	1451±600	0,52±0,04	271±49	37,6±0,5	4,5±0,2	0,237±0,005	<1	[117]
<i>Escherichia coli</i>	RihB	4,7±0,1	142±8	11,6±1,8	532±101	-	-	-	-	[186]
<i>Escherichia coli</i>	RihB	5,4±0,2	120±10	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	[184]
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	RihB	7,1±0,2	310±20	39,4±1,2	970±50	-	-	-	-	[163]
<i>Escherichia coli</i>	RihC	10,85±0,23	408±184	1,12±0,53	682±298	н.д.	н.д.	1,15±0,47	416±249	[6]
<i>Crithidia fasciculata</i>	RihC	н.д.	1220±40	н.д.	4700±500	н.д.	420±10	н.д.	460±30	[119]
<i>Salmonella enterica</i>	RihC	46±3	1060±100	7,8±1,3	9200±1200	н.д.	н.д.	2,06±0,07	160±20	[176]
<i>Lactobacillus buchneri</i> LBK78	RihC	3,6*	320±10*	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	[172]
<i>Agromyces</i> sp. MM-1	RihC	9,4±0,5*	3600±400*	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	[171]
<i>Leishmania major</i>	RihC	32±6	234±112	0,36±0,05	422±175	0,59±0,03	140±23	0,57±0,04	185±46	[122]

Таблица 6. Кинетические параметры гидролаз Rih в реакции с инозином и ксантозином. * – данные приведены для pH 7,2; ** – данные приведены для pH 6,0. Символ «-» означает отсутствие активности, н.д. – нет данных.

Организм	Тип гидролазы	$k_{cat}^{\text{инозин}}, \text{с}^{-1}$	$K_M^{\text{инозин}}, \mu\text{M}$	$k_{cat}^{\text{ксантозин}}, \text{с}^{-1}$	$K_M^{\text{ксантозин}}, \mu\text{M}$	Источник
<i>Trypanosoma vivax</i>	IAG-NH	5,19±0,08	5,37±0,42	н.д.	н.д.	[128]
<i>Trypanosoma cruzi</i>	IAG-NH	н.д.	18±0,1	н.д.	н.д.	[115]
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	IAG-NH	23,3±0,8	340±20	н.д.	н.д.	[182]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	IAG-NH	0,79±0,04	295±44	0,029±0,002	1038±274	[148]
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	IG-NH	28±1	1,9±0,4	6,2±0,3	280±40	[117]
<i>Escherichia coli</i>	RihB	-	-	н.д.	н.д.	[186]
<i>Escherichia coli</i>	RihB	0,086±0,003	2340±320	н.д.	н.д.	[184]
<i>Escherichia coli</i>	RihC	4,31±0,22	422±225	6,30±0,05	454±165	[6]
<i>Crithidia fasciculata</i>	RihC	44±3	150±40	н.д.	н.д.	[118]
<i>Salmonella enterica</i>	RihC	9,0±0,15* 8,1±0,14**	650±60* 1280±130**	62±8* 26,3±0,3**	5900±1000* 790±50**	[176]
<i>Crithidia fasciculata</i>	RihC	н.д.	380±30	н.д.	н.д.	[119]
<i>Leishmania major</i>	RihC	119±34	445±209	н.д.	н.д.	[122]

Из данных таблиц видно несколько закономерностей. Во-первых, для пуриновых гидролаз характерны довольно высокие значения k_{cat} для предпочтительных им субстратов и K_M порядка нескольких μM (в отдельных случаях нескольких десятков). При этом видно, что несмотря на то, что ксантозин тоже относится к пуриновым нуклеозидам, константы скорости ферментативной реакции и константы Михаэлиса там, где изучали кинетику ферментов с этим субстратом, значительно выше, чем константы для трёх других пуриновых нуклеозидов. Это может быть связано с тем, что дополнительная кето-группа в положении 2 пуринового кольца может вызывать стерические затруднения, а поскольку оба свободных электрона кислорода уже заняты в связи $\text{C}=\text{O}$, данная кето-группа, вероятно, плохо стабилизируется водородными связями и остатками заряженных аминокислот в активном центре фермента. При этом IAG-NH и IG-NH вступают в реакции и с пиримидиновыми нуклеозидами, однако константы Михаэлиса в таком случае на 2-3 порядка выше, а каталитические константы – на 2-3 порядка ниже, т.е. стабилизация обоих колец в пуриновых нуклеозидах за счёт π -стекинг-взаимодействий с остатками

триптофана в белках играет существенную роль в катализе. Без подобной стабилизации, как видно, реакция тоже возможна, но протекает очень плохо.

Во-вторых, для изученных ферментов RihB, относящихся к пиримидиновым гидролазам, наблюдается схожая закономерность: с пиримидиновыми нуклеозидами реакции протекают легко, причём K_M составляют уже порядка несколько сотен μM , а с пуриновыми нуклеозидами реакции либо не протекают в принципе, либо протекают с каталитическими параметрами на 2-3 порядка хуже таковых для реакции с пиримидиновыми нуклеозидами. Можно предположить, что это связано с размером гидрофобного кармана, в котором стабилизируется азотистое основание нуклеозида. Вполне возможно, этот карман недостаточно большой, чтобы вместить кольца пуриновых нуклеозидов, за счёт чего катализ либо совсем не происходит, либо происходит значительно хуже, чем с пиримидинами (возможно, ввиду конформационных изменений внутри активного центра и как следствие отдалении каталитически важных остатков от пуриновых нуклеозидов при вхождении их в активный центр).

В-третьих, для гидролаз RihC можно заметить, что эти ферменты наиболее специфичны к уридину или инозину, однако в отношении остальных субстратов нет какой-то чёткой закономерности по их предпочтительности для фермента. В среднем, K_M для RihC составляют порядка нескольких сотен μM , k_{cat} варьируется от нескольких единиц до сотни с^{-1} . Для бактериальных ферментов из *E. coli*, *S. enterica* характерна большая специфичность в отношении уридина. Для фермента из *E. coli* можно заметить, что все K_M примерно одинаковы, однако k_{cat} имеет наибольшее значение в реакции с уридином. Для фермента из *S. enterica* наибольшее значение k_{cat} наблюдается в реакции с ксантозином, однако K_M по этому субстрату почти в 10 раз больше K_M по уридину, хотя их каталитические константы отличаются всего в 1,5 раза. Ферменты из *Lactobacillus buchneri* LBK78 и *Agromyces sp.* MM-1 являются особым случаем, поскольку, как показано в работах [171,172], катализируют реакции с 2'-О-метилуридином. Эти ферменты уникальны ещё и тем, что максимальную активность проявляют при 70°C , хотя их стабильность значительно снижается при температурах выше 60°C , несмотря на то, что оптимальная температура для жизни организмов, из которых эти ферменты выделены, составляет 37°C и $28-30^\circ\text{C}$ (для разных видов *Agromyces* температурный оптимум жизни различается) соответственно. При этом у этих ферментов активность возрастает при температурах от 4°C до 40°C и является примерно постоянной в диапазоне $40-50^\circ\text{C}$ с резким возрастанием активности далее до 70°C и резким падением при ещё большем нагревании. Из этого можно предположить, что функция данной гидролазы в этих организмах может заключаться в ответе на стрессовые

условия, хотя не совсем понятно, почему наиболее высокая активность наблюдается при таких высоких температурах, при которых эти организмы не должны долго выживать.

Помимо этого, в некоторых работах не изучали кинетические параметры обнаруженных нуклеозидгидролаз, но исследовали количество рибозы, получаемой в ходе реакции при разных условиях. Например, в работе [147] исследовали бесклеточный экстракт культуры грибка *Aspergillus phoenicis* на предмет рибонуклеозидазной активности и обнаружили активность пуриновой гидролазы IAG-NH, причём наибольшую активность этот фермент проявлял по отношению к инозину в кислых условиях (рН 3,5) с температурным оптимумом 55°C. Сам организм не является при этом термофильным, однако является термотолерантным, чем можно объяснить такую высокую температуру оптимума работы фермента. В этой же работе показали, что при инкубировании экстрактов организма без добавления субстратов для IAG-NH фермент довольно быстро подвергается термоинактивации, однако в условиях насыщения субстратом фермент является стабильным и лучше всего катализирует реакции расщепления пуриновых нуклеозидов именно при этой температуре. Похожие результаты были получены для гидролаз из других грибков, в частности, из *Penicillium chrysogenum*, в котором содержатся две различные гидролазы, специфичные к пуриновым или к пиримидиновым нуклеозидам, из *Fusarium moniliforme*, в котором присутствует одна неспецифическая гидролаза [146]. Гидролазы из этих грибков также имеют рН оптимум в кислой области (рН оптимум для пуриновой гидролазы составляет 5,0, рН оптимум для пиримидиновой и неспецифической гидролаз составляет 6,2), хотя и не в такой сильнокислой среде, как фермент из работы [147], и температурный оптимум 50°C. При этом данные грибы не являются термофильными, оптимумы роста имеют при температурах 25-30°C, а гидролазы, хотя и проявляют наибольшую активность при повышенных температурах, имеют низкую термостабильность.

В других работах, например, в работе [139], исследовали активность фермента из *Pisum sativum* "Alaska" (аляскинский посевной горошек) в общем, не определяя конкретные кинетические параметры или количество выделяющейся рибозы в ходе реакции, и обнаружили примерно одинаковую активность фермента к различным рибонуклеозидам и даже к 2'-дезоксирибонуклеозидам. При этом рН-оптимум для данного фермента составил 6,0, что согласуется с данными для растительных гидролаз разных типов. Наибольшую активность данный фермент проявлял по отношению к аденозину, из чего можно предположить его физиологическую роль в растениях – регуляция концентрации цитокинина через регуляцию концентрации аденозина. В работе [140] исследовали

нуклеозидгидролазную активность экстракта из листьев и корней *Arabidopsis thaliana* (резуховидка Таля) и обнаружили два изофермента, для которых в смеси определили K_M по инозину, уридину и ксантозину (составляющие 200 μM по уридину и инозину и 60 μM по ксантозину). Наличие в геноме данного растения этих гидролаз связали с высоким содержанием уридина в почвах, где в дикой природе может произрастать данное растение. Однако, несмотря на это, оба изофермента не являются физиологически значимыми для данного растения, как было показано в этой же работе. Растения без одного или обоих генов обнаруженных рибонуклеозидгидролаз не имели никаких фенотипических отличий от растений дикого типа. Возможно, фермент используется растением в ответе на стрессовые условия, а при нормальной жизни практически не синтезируется и не играет никакой роли в метаболизме. Интересными свойствами обладают и рибонуклеозидгидролазы из мышц рыб *Ophiodon elongatus* (змеезуб) и *Sebastes sp.* (морские окуни). Гидролазы из этих двух организмов обладают очень схожими свойствами, как отмечено в работе [151]. Данные гидролазы являются неспецифическими и относятся к типу RihC. При этом наибольшую активность они проявляют при кислых рН (порядка 5) в отношении гуанозина, а при щелочных рН (порядка 8,5) – в отношении инозина. При рН 7,0 активность для всех субстратов либо находится в минимуме, либо стремится к минимуму. При этом авторы подтверждают, что такие необычные свойства проявляются не из-за разных изоформ фермента или даже набора из разных ферментов, а именно одним типом нуклеозидгидролазы. В случае данных гидролаз, как и в случае с грибковыми гидролазами, максимальная активность достигалась при температурах 50-55°C (хотя фермент инактивировался), что снова ставит вопрос о физиологической роли ферментов данного типа в рыбах, поскольку организмы, из которых были получены ферменты, не живут при таких высоких температурах. Возможно, рибонуклеозидгидролазы в животных и растениях являются лишь остаточными ферментами, доставшимися от древних предков и не исчезнувших в ходе эволюции, однако в таком случае встаёт вопрос о таком большом разнообразии и эволюции данных гидролаз – почему они продолжили эволюционировать вместе с организмами вместо того, чтобы остаться примерно такими же или исчезнуть из генома насовсем? Можно предположить и другое: рибонуклеозидгидролазы в нормальном состоянии не нужны организмам, причём как многоклеточным эукариотам, так и бактериям, они не играют никакой ключевой физиологической роли (кроме простейших паразитов, где эти ферменты, напротив, являются ключевыми в метаболизме азотистых оснований), однако эти ферменты участвуют в ответе на стрессовые условия для организма.

2.5. Стабильность гидролаз Rih

Обычно стабильность ферментов к химическим воздействиям и температурная стабильность определяются организмом, в котором этот фермент находится. Ферменты из мезофильных организмов, как правило, не обладают высокой термостабильностью и легко подвергаются окислению и разрушению в присутствии химических агентов, а ферменты из термофильных организмов, наоборот, часто обладают высокой термостабильностью и менее подвержены окислению. Это связано со структурой белков: у более термостабильных белков обычно имеется более жёсткая структура, т.е. присутствуют ковалентные сшивки (дисульфидные связи остатков цистеина), менее подвижные элементы (большее количество остатков пролина), большее количество гидрофобных аминокислот, обеспечивающих сильные гидрофобные взаимодействия внутри белковой глобулы.

Что касается гидролаз Rih, закономерности о стабильности белков в зависимости от стабильности организмов сохраняются, хотя и есть некоторые интересные особенности. Как было упомянуто ранее, гидролаза IAG-NH из *A. phoenicis* имеет наибольшую каталитическую активность с разными рибонуклеозидами при 55°C [147]. При этом в таких условиях белок подвержен температурной инактивации и всего за 10 минут инкубирования теряет 50% своей активности в случае с инозином. Сам организм, хотя и не является термофильным, является термотолерантным [142], т.е. оптимальные условия жизни организма схожи с условиями мезофильных организмов, но этот организм также может выдерживать повышенные температуры. Однако, в работе [147] было показано, что при добавлении к ферменту субстрата, например, инозина, с последующей инкубацией при 55°C термостабильность фермента возрастает, т.е. закрытая форма фермента является более термостабильной. Пиримидиновая гидролаза из *Aspergillus terreus* обладает схожей стабильностью, сам организм при этом так же, как и предыдущий, является термотолерантным, но не термофильным. Гидролаза также имеет наибольшую каталитическую активность при 55°C, но при этом, в отличие от предыдущего случая, при данной температуре она является стабильной и сохраняет активность в течение многих часов инкубации [145]. Увеличение температуры нагрева до 60°C приводит к снижению ферментативной активности на 50% за 15 минут.

В целом, для гидролаз из мезофильных организмов оптимум каталитической активности наблюдается при 30-40°C (исключение составляют некоторые гидролазы из термотолерантных организмов, например, упомянутые выше), а при нагревании выше 50°C эти ферменты теряют 50% своей активности меньше, чем за час [143,146,151,167]. Гидролазы из термотолерантных организмов обычно являются более термостабильными,

способными выдерживать инкубацию при 50-60°C без существенной потери активности в течение часа или даже нескольких часов [145,147,171,172,176]. Помимо этого, гидролазы Rih были также обнаружены и в термофильных организмах. Например, пиримидиновая и пуриновая гидролазы из *Saccharolobus solfataricus* (ранее названный *Sulfolobus solfataricus*) имеют оптимум ферментативной активности при температуре 100°C, при этом инкубирование ферментов при данной температуре в течение 10 минут вызывает потерю 10% активности. Инкубирование в течение 10 минут при 110°C приводит к потере 80% ферментативной активности [163,164,182]. С точки зрения структуры такая высокая стабильность объясняется большим количеством остатков Leu и Ile по сравнению с другими гидролазами, а также наличием дисульфидных связей. Эти два фермента также являются очень стабильными по отношению к воздействию гуанидин хлорида. Концентрация гуанидин хлорида, при которой половина фермента денатурирована, составляет примерно 3,5 М, при этом денатурация обратимая, и при диализе полностью восстанавливается ферментативная активность. Ферменты являются стабильными и по отношению к восстанавливающим агентам, например, дитиотреитолу (DTT). При воздействии 0,6М DTT в течение часа ферментативная активность падает на 40%, что подтверждает наличие дисульфидных связей в ферменте, стабилизирующих его структуру [164,182].

2.6. Практическое применение гидролаз Rih

Как было упомянуто ранее, у большинства организмов, в т.ч. у млекопитающих, получение азотистых оснований происходит либо через синтез *de novo*, либо с участием фосфорилаз в процессе расщепления рибонуклеозидов. Гидролазы Rih в данном случае не играют никакой существенной роли. В то же время трипаносомы и другие простейшие являются ауксотрофами по пуринам и не могут сами синтезировать их. Для этих организмов нуклеозидгидролазы играют ключевую роль в метаболизме и в получении азотистых оснований, поскольку нуклеозидфосфорилазная активность не была обнаружена у данных организмов [187]. Такое различие в метаболизме простейших паразитов и их организмов-хозяев делает гидролазы Rih потенциальной мишенью для разработки препаратов против этих паразитов.

Первые ингибиторы Rih были основаны на структуре переходного состояния ферментативной реакции. Лучшими аналогами стандартных рибонуклеозидов являлись производные иминорибитола [188]. RihC из *C. fasciculata* ингибировалась фенол-иминорибитолами, причём константы ингибирования были порядка нМ. Иминорибитолы, связанные с пуриновыми кольцами, (иммуцилины) были менее эффективны в ингибировании этого фермента, но хорошо ингибировали ферменты IAG-NH и IG-NH с

константами порядка нМ [189]. Структуры некоторых ингибиторов представлены на рисунке 16.

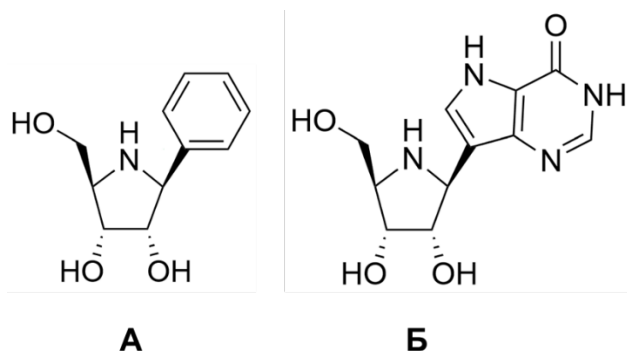


Рис.16. Структура некоторых первых ингибиторов Rih на основе иминорибитола. А – фенил-иминорибитол, Б – иммуцилин Н (immucillin H)

Однако, как оказалось, иммуцилины являются также сильными ингибиторами человеческих нуклеозидфосфорилаз и поэтому не могут быть использованы в качестве терапевтического препарата. Хотя у человека есть другие пути метаболизма нуклеозидов, помимо использования нуклеозидфосфорилаз, эти ферменты являются ключевыми для производства организмом Т-клеток, поэтому нарушение их работы ведёт к иммунодефициту [190]. В связи с этим исследователи усиленно вели поиск новых молекул для селективного ингибирования нуклеозидгидролаз. В результате были получены N-арилметильные производные иминорибитола, использование которых дало селективность к гидролазам в 1000 раз превышающую селективность к фосфорилазам [191]. Два таких ингибитора представлены на рисунке 17.

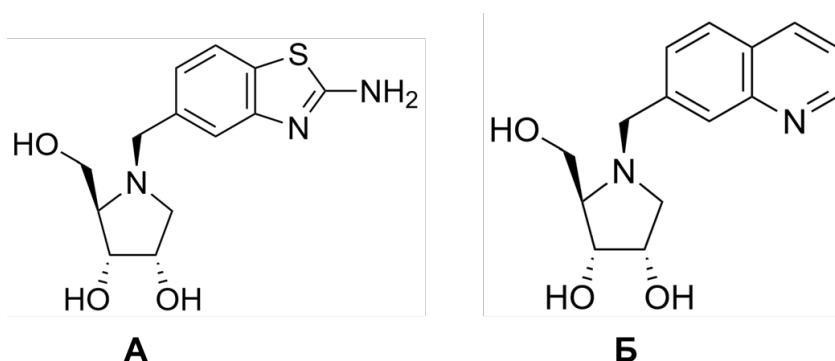


Рис.17. Структура двух производных иминорибитола UAMC-00311 (А) и UAMC-00115 (В) в 1000 раз более селективные к гидролазам, чем к фосфорилазам, как показано в [191].

Помимо непосредственно ингибирования нуклеозидгидролаз простейших существует также подход по использованию частей этих ферментов в вакцинах против паразитов. Например, Rih из *Leishmania donovani* является одним из наиболее

иммуногенных белков из экстрактов мастигот этого организма и поэтому используется (в виде рекомбинантного белка) в вакцинах против мышинных и собачьих заболеваний, вызываемых простейшими [192].

Другой подход основан на GDEPT (gene-directed enzyme prodrug activation therapy), т.е. на ферментативном превращении нетоксичного пролекарства в его активную токсичную форму экзогенным ферментом, экспрессируемым в целевых клетках (обычно в неопластических клетках). И хотя эволюционно ферменты Rih нужны для катализа расщепления природных рибонуклеозидов, они также могут расщеплять N-гликозидную связь в и неприродных аналогах (рисунок 18).

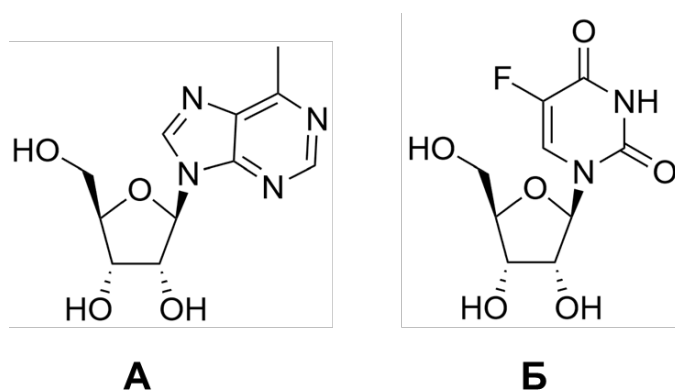


Рис.18. Аналоги природных рибонуклеозидов. А – 6-метилпуринрибозид, Б – 5-фторуридин

Фермент IAG-NH из *Trypanosoma vivax* может расщеплять 6-метилпуринрибозид, высвобождая токсичный продукт, 6-метилпурин, нарушающий синтез белков и РНК. Данный белок используется в двух современных подходах, связанных с доставкой пролекарства в нужное место и высвобождения там активной формы лекарства. Первый подход – это инкапсулирование в липосомы со встроенным бактериальным транспортёром OmpF [193]. Второй подход – это создание реактора с амфифильным трёхкомпонентным сополимером. Оба подхода могут быть перспективными для терапии рака.

Фермент RihB из *E. coli* проявляет каталитическую активность к 5-фторуридину [186]. Продукт расщепления этого нуклеозида 5-фторурацил является одним из первых терапевтических веществ, использованных против твёрдых опухолей. Ферменты раковых клеток превращают 5-фторурацил в соответствующие нуклеотиды и дезоксинуклеотиды, из которых в дальнейшем строятся молекулы РНК и ДНК, приводя к нарушению сборки рибосомы. Фермент тимидилатсинтаза ингибируется производным 5-фторурацила фтордезоксиуридилатом (другие названия: FdUMP, 5-фтор-2'-дезоксиуридин 5'-монофосфат), что приводит к недостатку тимидина и последующему апоптозу. Однако

5-фторурацил быстро выводится из организма через печень, что уменьшает количество нуклеотидов, которые могут из него синтезироваться. В настоящее время для обычной раковой терапии используются производные 5-фторурацила, например, капецитабин, однако такие производные не являются биодоступными. Использование фермента RihV для раковой терапии могло бы увеличить эффективность и биодоступность [186]. Если доставить этот фермент в опухоль и в качестве субстрата использовать 5-фторуридин, то в опухоли можно ожидать большее накопление 5-фторурацила, чем в других тканях, что, во-первых, снизило бы общую токсичность этого вещества для организма, а во-вторых, повысило бы эффективность противоопухолевой терапии.

Помимо этого, ферменты Rih можно использовать и в биотехнологическом синтезе важных органических молекул в качестве альтернативы обычному химическому синтезу. Например, было показано [194], что использование в качестве whole cell biocatalyst (клетка-катализатор) клеток *E. coli*, экспрессирующих RihA, является эффективным способом получения больших количеств урацила (30 г/л и больше). Использование таких катализаторов позволяет получить большее количество более чистого продукта, чем органический синтез, без использования токсичных для окружающей среды веществ, что является несомненным преимуществом.

Ещё одно интересное применение было предложено для N-метилнуклеозидазы. Этот фермент, как было отмечено ранее, является ключевым участником в производстве кофеина из ксантозина в некоторых растениях. Исследователи в [195] создали трансгенное растение табака на основе *Nicotiana tabacum*, в котором одним из привнесённых генов являлся ген N-метилнуклеозидазы, и заметили, что из-за производства кофеина в этом трансгенном растении оно начало отпугивать некоторых вредителей, в частности, табачную совку *Spodoptera litura*. Такой метод можно использовать в качестве перспективного нового метода борьбы с вредителями растений вместо традиционных пестицидов.

В заключении данного литературного обзора хотелось бы отметить, что рибонуклеозидгидролазы являются интересным, малоизученным семейством ферментов с потенциально полезным применением в биотехнологическом синтезе или в разработке и доставке противораковых препаратов. Физиологическая роль ферментов данного семейства в некоторых организмах остаётся не до конца изученной, поэтому перспективным является открытие, клонирование и изучение свойств таких гидролаз из разных организмов. В ходе такого фундаментального изучения можно разработать и новые методы применения данных гидролаз на практике или же усовершенствовать старые.

III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Материалы

Для клонирования гена фермента использовали следующие реагенты: ДНК-полимераза из термостабильного организма *Pyrococcus furiosus* (Pfu-ДНК-полимераза) («Thermo Scientific», США), буфер для ПЦР 10X с MgSO₄ («Thermo Scientific», США), эндонуклеазы рестрикции NdeI, XhoI (серия FastDigest, «Thermo Scientific», США), 10x буфер FD Green Buffer («Thermo Scientific», США), лигаза фага T4 («Thermo Scientific», США), буфер для лигирования 10x («Thermo Scientific», США), ДНК-праймеры, представленные ниже («Синтол» Россия), агароза («Thermo Scientific», США).

LreRihC_HisN_for: 5' – GAA GGA GAT ATA CAT ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC ACT ACA AAG ATT ATT ATG GAT ACT GAC CCA – 3'

LreRihC_HisN_rev: 5' – GTG GTG GTG GTG CTC GAG TCA TTT CAT TTT GCT TAC TTC TTC TAA GAA CCA CTT – 3'

LreRihC_HisC_for: 5' – GAA GGA GAT ATA CAT ATG ACT ACA AAG ATT ATT ATG GAT ACT GAC CCA – 3'

LreRihC_HisC_rev: 5' – GTG GTG GTG CTC GAG TCA GTG GTG GTG GTG GTG GTG TTT CAT TTT GCT TAC TTC TTC TAA GAA CCA C – 3'

В микробиологических экспериментах использовали бактотриптон («Difco», США), дрожжевой экстракт («Difco», США), агар («Difco», США), глицерин (99,9%, «ultra pure») («Panreac», Испания), лизоцим («Fluka/BioChemika», Швейцария), хлорид кальция и хлорид натрия, гидрофосфат калия «ultra pure» («Merck», Германия), антибиотики канамицин («Синтез», Россия) и хлорамфеникол («Sigma», США), дигидрофосфат натрия «ч.д.а.» («РеаХим», Россия), питательная среда 2YT с глицерином (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1,5 г/л дигидрофосфата натрия, 1 г/л гидрофосфата калия, pH 7,5, 10 мл/л глицерина), штаммы бактерий *E. coli* DH5α: fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Ф80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR1 и *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus /pLysS: В F– ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [pLysS argU ileY leuW Camr].

Для очистки белков были использованы колонки для металл-хелатной хроматографии HisTrap FF 1 ml (Cytiva, США). Для электрофореза белков использовали Трис («ДиаЭМ», Россия), акриламид («ДиаЭМ», Россия), бис-акриламид («ДиаЭМ», Россия), SDS («Panreac», Испания), глицин («Merck», Германия), бромфеноловый синий («Sigma», Япония), меркаптоэтанол («Merck», Германия), персульфат аммония («IBI Scientific», США), ТЕМЕД («IBI Scientific», США).

Кинетические измерения проводили с использованием уридина, цитидина, аденозина, гуанозина, тимидина, 2'-дезоксинуридина 99% чистоты (Sigma-Aldrich, США), воды, очищенной на установке MiliQ.

Для экспериментов по кристаллизации использовали 96-луночные планшеты VDX (Hampton Research, США) и коммерческие сита для кристаллизации от Hampton Research (США) и Molecular Dimensions Inc (Голландия, Огайо, США).

Для исследования антибактериальной активности RihC использовали следующие реактивы и приборы: генцианвиолет (crystal violet), культуры микроорганизмов, бульон Мюллера-Хинтона, дистиллированная вода, этиловый спирт 96%, денситометр Densi-Lameter, дозаторы, в т.ч. многоканальный, планшеты 96-луночные U-образные и плоскодонные, термостат, спектрофотометр. Использованные штаммы микроорганизмов: ecl 3118, рае 3839, рае 3700, рае 3611, рае 3651, ecl 3514, есо 3941, есо 3916, есо 3676, kpn 3885, kpn 3903, kpn 1989, aba 505, aba 390, aba 492, sau 1243, sau 1155, sau 1380, efa 128, efa 172, efa 156.

3.2. Методы исследования

3.2.1. Получение модельных структур белка

Моделирование структуры RihC было произведено с помощью бесплатной версии ресурса AlphaFold2 на базе Google Collab [196,197]. В качестве степени олигомеризации выбирали гомодимер или гомотетрамер. Для MSA (multiple sequence alignment) выбирали режим mmseqs2_uniref_env, в качестве model_type выбирали alphafold2_multimer_v3. Количество recycles было равно 3, pairing_strategy был выбран "greedy". Визуализацию структур проводили с помощью программы PyMOL [198].

3.2.2. Получение генетических конструкций RihC

Фермент RihC был клонирован из бактерий *Limosilactobacillus reuteri* LR1 (штамм был любезно предоставлен Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»)) с добавлением на N- или C-конец фермента последовательности из шести остатков гистидина (His-tag) для ускорения и упрощения процесса очистки фермента (далее обозначаются RihC_HisN для фермента с His-tag на N-конце и RihC_HisC для фермента с His-tag на C-конце). Для клонирования гена фермента выделяли геномную ДНК лактобактерий. Для этого клетки лактобактерий культивировали без качания в 20 мл среды MRS (протеозоупептон 10 г/л, мясной экстракт 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, глюкоза 20 г/л, Твин-80 1 г/л, цитрат аммония 2 г/л, ацетат натрия 5 г/л, сульфат магния 0,1 г/л, сульфат марганца 0,05 г/л, гидрофосфат натрия 2 г/л)

при 37°C до помутнения среды. Клетки осаждали при 4°C 10000 об/мин в течение 5 минут, суспендировали 20 мкл раствора лизоцима и РНКазы А в воде (концентрация лизоцима 50 мг/мл, концентрация РНКазы А 2 мг/мл) 20 минут при 37°C. ДНК выделяли с помощью набора DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Ген фермента был клонирован с геномной ДНК *L. reuteri* с помощью ПЦР, используя две пары праймеров, представленные ниже, и вставлен в векторную плазмиду pET24a, содержащую ген устойчивости к канамицину.

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 5 мкл 10-кратного буфера для *Pfu* ДНК-полимеразы (200 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25 C), 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 100 мМ KCl, 1 мг/мл БСА, 1% (v/v) Тритон X-100, 20 мМ MgSO₄); 5 мкл смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, концентрация каждого 2,5 мМ); 1 мкл ДНК-матрицы (≈50 нг/мкл); по 2 мкл праймеров (10 мМ); 0,5 мкл *Pfu* ДНК-полимеразы (2,5 Ед/мкл) и деионизованную воду до общего объема смеси 50 мкл. ПЦР проводили в тонкостенной пластиковой пробирке объемом 0,2 мл (Eppendorf, Германия) на приборе BioRad T100 Thermal Cycler (BioRad, США). Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95°C и затем проводили реакцию по следующей программе: денатурация – 95°C, 30 с; связывание праймеров – 54-58°C, 1 мин, удлинение цепи – 72°C, 2 мин, всего 25-35 циклов. После последнего цикла реакционную смесь дополнительно выдерживали 10 мин при 72°C. Температуру на второй стадии выбирали на 3-5 градусов ниже температуры плавления дуплексов (T_m), образуемых праймерами.

Продукты ПЦР очищали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с последующим выделением фрагментов ДНК из геля. Очищенные продукты, а также выбранный вектор pET-24a(+) обрабатывали рестриктазами NdeI и XhoI. Вектор был подобран таким образом, чтобы ген фермента в этом векторе находился под сильным промотором РНК-полимеразы фага T7. Для создания рестрикционной смеси в тонкостенные пробирки на 0,5 мл (Eppendorf, Германия) добавляли 2 мкл 10x буфера для работы рестриктазы FD Green Buffer (Thermo Scientific, США), 10 мкл ПЦР-продукта или 2 мкл векторной плазмиды, воду, очищенную на установке MiliQ, для доведения объема до 19 мкл, а затем 0,5 мкл рестриктазы NdeI и 0,5 мкл рестриктазы XhoI (серия FastDigest, Thermo Scientific, США). Смеси инкубировали 1 час при 37°C, затем очищали так же, как ПЦР-продукты. Очищенные фрагменты после рестрикции лигировали, используя T4 ДНК-лигазу фирмы Thermo Scientific (США) по протоколу производителя. Полученными после лигирования смесями трансформировали клетки *E. coli* DH5α. Для контроля получения требуемых генетических конструкций проводили секвенирование плазмидной ДНК в

Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН).

3.2.3. Экспрессия фермента в клетках *E. coli*

Полученные плазмиды, содержащие ген RihC_HisN или RihC_HisC, использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма BL21(DE3), устойчивых к хлорамфениколу. Вектор pET-24a(+), в который был клонирован ген RihC, имеет ген устойчивости к канамицину. Трансформированные клетки высевали на агаризованную питательную среду 2YT, содержащую антибиотики канамицин (конечная концентрация 30 мкг/мл) и хлорамфеникол (конечная концентрация 25 мкг/мл) и инкубировали 12-14 часов при 37°C. Далее колонии выросших бактерий переносили в 4 мл жидкой питательной среды 2YT, содержащей антибиотики канамицин и хлорамфеникол в упомянутых выше концентрациях и инкубировали 12-14 часов на качалке при 30°C и 180 об/мин. После этого 20 мкл суспензии клеток переносили в колбы для культивирования в 20 мл жидкой питательной среды 2YT, содержащей антибиотик канамицин в упомянутой выше концентрации и инкубировали при 37°C и 180 об/мин до достижения поглощения при 600 нм $A_{600} = 0,8-1$. Далее весь объём колб переносили в большие колбы для культивирования в 180 мл жидкой питательной среды 2YT без антибиотиков и выращивали клетки при 30°C и 100 об/мин до достижения поглощения $A_{600} = 0,8-1$. По достижении нужного поглощения делали индукцию IPTG (конечная концентрация в колбе 0,1 мМ), прodelывали отверстия в фольге, закрывающей колбы, для улучшения аэрации и инкубировали при 20°C и 120 об/мин 16-18 часов. Далее колбы снимали с качалки, суспензию клеток осаждали на центрифуге Eppendorf 5804 R при 4°C и 5000 об/мин, супернатант сливали. Клетки ресуспендировали в буфере, содержащем 0,05M Tris-HCl, 0,5M NaCl, 0,02M имидазола pH 7,5 (буфер А) в соотношении 4:1 по массе (4 части буфера на одну часть клеток). Полученные суспензии клеток замораживали на -20°C до очистки.

3.2.4. Выделение и очистка фермента

Клетки *E. coli*, содержащие фермент RihC, разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе. Клеточный дебрис осаждали на центрифуге Eppendorf 5804 R при 4°C и 6000 об/мин, супернатант переносили в чистые фальконы. Очистку проводили на хроматографе АКТА Start на колонке HisTrap FF 1 ml (Cytiva, США). Колонку предварительно уравнивали буфером А. Супернатант после разрушения клеток наносили на колонку при потоке 0,5 мл/мин. После исчезновения пика поглощения примесных белков на 280 нм, которые не связались с колонкой, целевой фермент элюировали линейным градиентом повышения концентрации буфера Б (0,05M Tris-HCl,

0,5M NaCl, 0,5M имидазола pH 7,5). Полученный препарат фермента обессоливали с помощью гель-проникающей хроматографии (гель-фильтрации) на колонке Sephadex G25 в буфер, содержащий 0,1M NaH_2PO_4 , 0,01M ЭДТА pH 7,0. Чистоту полученного ферментативного препарата подтверждали с помощью электрофореза ПААГ в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) согласно методике, представленной в [199].

Подтверждение аминокислотной последовательности препарата RihC проводили с помощью MALDI-масс-спектрометрии. При проведении данных исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук». После окрашивания геля SDS-PAGE с помощью кумасси из этого геля вырезался кусочек, содержащий целевой фермент (3–4 мм³), дважды промывался 100 мкл 40% ацетонитрила в 0,1 M NH_4HCO_3 20 мин при 37°C для удаления краски и помещался в 100 мкл ацетонитрила для удаления воды. После удаления воды кусочек геля был высушен для удаления ацетонитрила, и затем к нему добавлено 3,5 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega, США) в 0,05 M NH_4HCO_3 . Гидролиза проводили 20 часов при 37°C, затем добавляли 5,25 мкл раствора 0,5% трифторуксусной кислоты (TFA) в 50% водном растворе ацетонитрила и тщательно размешивали. Полученный супернатант использовали для MALDI MS анализа. Образцы для MS готовили смешиванием 1,5 мкл триптического гидролизата с 0,5 мкл 2,5-дигидроксibenзоиевой кислоты (10 мг/мл в 20% водном ацетонитриле, 0,5% TFA; Sigma–Aldrich, США). Получившуюся смесь высушивали на воздухе. Масс спектры записывали с помощью Ultraflextreme MALDI-TOF/TOF масс-спектрометра (Bruker, Германия), оснащённого положительно-ионным УФ лазером и рефлектроном. Погрешность измерений моноизотопных масс после рекалибровки с пиками трипсинового автолизата составляла 0,002–0,011% (20–110 ppm). Спектры были получены в диапазоне масс 500–6500 m/z; мощность лазера подбирали для достижения лучшего разрешения. Белки определяли с помощью программы Mascot (Matrix Science Ltd, США). Масс спектры были анализированы с помощью программы FlexAnalysis 3.3 (Bruker, Германия). Используя программу Mascot (опцию “peptide fingerprint”), изучали локальную базу данных с заданной точностью, принимая в расчёт следующие возможные модификации: ацетилирование (N-конец белка), Gln pyroGlu (N-концевой Q), окисление (M), пропионамидирование (C). Потенциальные белки с confidence score > 42 по базе данных NCBI были определены достоверно (p < 0.05).

3.2.5. Определение олигомерного состава фермента

Определение олигомерного состава фермента проводили с помощью аналитической гель-проникающей хроматографии (гель-фильтрации) на хроматографе АКТА Start на колонке HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (Cytiva, США). Для построения градуировочной кривой использовали набор стандартов молекулярных масс для гель-фильтрации и аналитического электрофореза Gel Filtration Calibration Kit HMW (Cytiva, США). Уравновешивание колонки и калибровку проводили согласно протоколу производителя. Исследуемый образец вносили на колонку в количестве 1 мг и наблюдали время удерживания его на колонке. Далее, используя предварительно построенную калибровочную кривую, определяли молекулярную массу образца и сравнивали её с теоретической массой мономера, из чего делали вывод об олигомерном составе фермента.

3.2.6. Синтез сорбентов для измерения активности фермента

Синтез неподвижной фазы на основе матрицы из силикагеля с привитыми аминопропильными радикалами Диасфер-110-Амин (ЗАО «БиоХимМакСТ», Россия) со сферическими частицами диаметром 5 мкм, содержащей 1,70% азота (средний диаметр пор 11 нм, удельная поверхность 200 м²/г; характеристики сорбента предоставлены производителем) проводили согласно [200,201]. К матрице последовательно добавляли кетон (ацетон), соответствующий 2-морфолиноэтилизотиоцианид и карбоновую кислоту (гликолевую).

3.2.7. Заполнение хроматографических колонок

Для упаковки сорбента использовали стальную колонку размером 100×3, заполнение которой осуществляли при помощи насоса Knauer K-1900 (Knauer, Германия). Для заполнения колонок использовали смесь 10 мл 0.1 М раствора KCl, 8 мл этанола и 2 мл 1,4-диоксана для приготовления суспензии сорбентов. В качестве подвижной фазы для сорбента на основе силикагеля использовали дегазированный ацетонитрил. Заполнение колонки проводили при давлении 300–400 бар.

3.2.8. Постановка ферментативной реакции

Для постановки ферментативной реакции использовали уридин, цитидин, аденозин, гуанозин, инозин, тимидин, 2'-дезоксинуридин 99% чистоты фирмы Sigma-Aldrich (США), воду, очищенную на установке MiliQ. Реакцию ставили следующим образом: растворяли сухой рибонуклеозид в буфере С (0,05М Tris-HCl pH 7,5) до концентрации 100 мМ, в пластиковые пробирки на 1,5 мл (Eppendorf, Германия) добавляли 500 мкл рибонуклеозида в требуемой концентрации, получаемой разбавлением исходного раствора буфером С, причём для каждой концентрации делали пять одинаковых проб. Количество концентраций

зависит от количества точек на кривой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, которая в дальнейшем нужна для определения кинетических параметров фермента, и варьируется, в среднем, от 10 до 20. В каждую пробу добавляли 5 мкл очищенного препарата RihC_HisN или RihC_HisC в концентрации примерно 200 мкг/мл (конечная концентрация в растворе составляет 2 мкг/мл) и перемешивали. Через определённые промежутки времени ферментативную реакцию останавливали добавлением 5 мкл $\text{HCl}_{\text{конц}}$ (времена составляли 5, 10, 15, 20, 30 секунд для реакции с уридином, для других субстратов времена варьировали для достижения оптимальных условий). Готовые пробы использовали в дальнейшем для проведения анализа.

3.2.9. Проведение анализа с помощью ГИХ

Для проведения анализа использовали урацил, цитозин, аденин, гуанин, гипоксантин, тимин 99% чистоты фирмы Sigma-Aldrich (США), воду, очищенную на установке MilliQ, ацетонитрил «HPLC gradientgrade» (Panreac, Германия). Эксперименты проводили с помощью системы ВЭЖХ, состоящей из хроматографа «Dionex3000» с двухканальным градиентным насосом, автоматической системой ввода пробы, термостатом колонки и спектрофотометрическим детектором на диодной матрице. Для регистрации хроматограмм использовали персональный компьютер и программный пакет Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, США). Разделение азотистого основания и нуклеозида проводили с использованием смеси 20 мМ аммонийно-ацетатного буферного раствора с pH 4,7 и ацетонитрила (10:90 об. %) в качестве подвижной фазы, скорость потока элюента составляла 1 мл/мин, температура термостата 30°C, УФ-детектирование проводили при 254 нм. Перед началом анализа подготавливали серию растворов азотистого основания в буфере С с известными концентрациями (для конкретного субстрата, например, урацил для исследования ферментативной активности по уридину и т.д.). Все пробы (как азотистого основания, так и анализируемых проб) вносили в чистые виалы по 100 мкл каждую, затем добавляли к каждой 900 мкл ацетонитрила. Каждую из проб азотистого основания вкалывали в хроматограф для построения градуировочной зависимости площади пика от концентрации. Также делали набор «холостых» вколов раствора рибонуклеозида определённой концентрации, чтобы проверить, нет ли примесей азотистого основания. После этого анализируемые пробы вкалывали в хроматограф и регистрировали площади пиков азотистого основания и нуклеозида, причём каждую пробу вкалывали в трёх повторах для проверки сходимости данных. Площади пиков азотистого основания переводили в дальнейшем в концентрации с помощью градуировочной зависимости. Полученные данные использовали для построения зависимости скорости ферментативной

реакции от концентрации субстрата, из которой определяли кинетические параметры данной реакции в программе Origin Pro 8.5.

3.2.10. Определение кинетических параметров RihC

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата получали, как описано выше. Данную зависимость анализировали в программе Origin Pro 8.5. Константу Михаэлиса K_M определяли с помощью нелинейной регрессии в диапазоне концентраций субстрата $0,5K_M-5K_M$. Из этой же зависимости определяли максимальную скорость ферментативной реакции V_{max} . Концентрацию очищенного фермента определяли по поглощению раствора белка на 280 нм с использованием расчётного коэффициента экстинкции по формуле: $C_{\text{белка}} \text{ (мг/мл)} = A_{280}/\epsilon l$, где l – длина оптического пути, равная 1 см. Измерение поглощения раствора фермента проводили в кварцевых кюветах с оптическим путём 10 мм на спектрофотометре «Schimadzu UV1800 PC». С помощью V_{max} и $C_{\text{белка}}$ рассчитывали константу скорости ферментативной реакции k_{cat} из уравнения $V_{max} = k_{cat} * C_{\text{белка}}$.

3.2.11. Изучение термостабильности фермента

Для изучения термостабильности фермента RihC использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Исследование температурной стабильности проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре Nano DSC (TAInstruments, США). Рабочий объем капиллярных калориметрических платиновых ячеек составлял 300 мкл. Для предотвращения образования пузырьков и закипания растворов при повышении температуры в ячейках калориметра поддерживали избыточное давление, равное 3 атм. Перед проведением эксперимента определяли значения инструментальной базовой линии, которые затем вычитали из данных, полученных для белка. При измерениях в контрольную ячейку помещали буферный раствор, а в рабочую – раствор исследуемого фермента в том же буферном растворе. В качестве буферного раствора использовали 0,1 М NaPB pH 7,0. Концентрация ферментов составляла 1–2 мг/мл, а скорость прогрева – 1°C/мин.

Помимо этого, для оценки температурной стабильности RihC исследовали кинетику термоинактивации этого белка. Температурная стабильность фермента была изучена в 0,1 М NaPB pH 7,0 при нескольких температурах в диапазоне 50-56°C. Для каждого эксперимента была подготовлена серия растворов фермента (0,2 мг/мл) в пластиковых пробирках объёмом 0,5 мл по 100 мкл в каждой. Пробирки помещали в водяной термостат, нагретый до нужной температуры (точность нагревания $\pm 0,1^\circ\text{C}$). Через определённые промежутки времени пробирки вытаскивали из термостата и помещали в лёд на 5 минут,

после чего центрифугировали 3 минуты при 12000 на центрифуге Eppendorf 5415D. Остаточную ферментативную активность мерили, как описано выше. Константу скорости термоинактивации определяли как наклон прямой зависимости натурального логарифма остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты $\ln(A/A_0) - t$) с помощью линейной регрессии в программе OriginPro 8.5.

3.2.12. Кристаллизация и сбор данных

Первоначальный скрининг кристаллизации проводили на роботизированной системе (Rigaku Americas Corporation, США) с использованием 96-луночных планшетов VDX (Hampton Research, США) и коммерческих сит для кристаллизации от Hampton Research (США) и Molecular Dimensions Inc (Голландия, Огайо, США) методом диффузии пара «сидячая капля». 10 мг/мл RihC в 20 мМ Трис-НСl-буфере рН 8,0 смешивали с раствором для кристаллизации в соотношениях 1:1, 1:2 и 2:1 (объем капли 0,3 мкл). Объем осадительного раствора в резервуаре составлял 50 мкл. Кристаллизацию наблюдали в следующих условиях: 0,2 М тетрагидрат ацетата магния, 0,1 М тригидрат какодилата натрия рН 6,5 20% вес/объем полиэтиленгликоля 8000 при соотношении 1:1 при 288 К.

Таблица 7 Сбор и уточнение данных кристаллизации

Место съёмки	ИОХ РАН
Длина волны (Å)	1,54
Температура (К)	100
Детектор	HuPix-6000HE
Расстояние до кристалла (мм)	32,0
Диапазон поворота на снимок (°)	0,35
Суммарный диапазон поворота (°)	344,75
Пространственная группа	P12 ₁
a, b, c (Å)	84,11, 81,53, 86,85
α, β, γ (°)	90,0, 95,8, 90,0
Средняя мозаичность (°)	0,27
Разрешение (Å)	63,38–1,90 (1,93–1,90)
Полнота (%)	99,8 (100)
Средняя избыточность	6,4 (6,6)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	19,5 (5,5)
R _{meas} (%)	9,1 (37,7)
CC _{1/2}	91,4 (95,6)
R _{fact} (%)	16,9
R _{free} (%)	20,1
RMSD связей (Å)	0,01
RMSD углов (°)	1,85
Наиболее благоприятные по Рамачандрану (%)	96,8
Допустимые по Рамачандрану (%)	3,1
PDB код	8QND

Кристаллы RihC ненадолго замачивали в маточном растворе, содержащем 20% глицерина, непосредственно перед сбором данных дифракции и мгновенно замораживали в жидком азоте. Наборы данных были собраны при 100 К в лаборатории Rigaku OD XtaLAB Synergy-S (ИОХ РАН, Россия). Наборы данных были проиндексированы, интегрированы и масштабированы с использованием пакета XDS [202]. Пространственная группа была предложена Pointless [203] как P12₁1 (таблица 7).

3.2.13. Решение и уточнение структуры

Структура RihC была решена методом молекулярного замещения с использованием программы MOLREP [204] с координатами атомов RihA из *E. coli* (PDB ID: 3G5I) в качестве исходной модели. Четыре копии белка были обнаружены в асимметричной единице. Уточнение структуры проводили с помощью программы REFMAC5 пакета CCP4 [205]. При уточнении учитывались изотропный B-фактор и атомы водорода в фиксированных положениях. Ручное перестроение модели осуществлялось с помощью интерактивной графической программы COOT [206].

3.2.14. Анализ и валидация структуры

Визуальный осмотр моделированной структуры проводили в программах COOT и PyMOL Molecular Graphics System, Version 4.6 (Schrödinger, USA). Сравнение и наложение структур проводили в программе PDBeFOLD [207]. Контакты анализировали в программе PDBePISA [208].

3.2.15. Изучение антибактериальной активности фермента RihC и его влияния на образование биоплёнок

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 проверки антибактериальной активности фермента RihC предварительно было собрано 35 изолятов, относящихся к группе патогенов ESKAPE, а также *Escherichia coli*. Культивирование микроорганизмов проводили на твёрдой среде Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США). Определение МПК известных антибиотиков для этих микроорганизмов проводили методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США), с определением минимальной подавляющей концентраций (МПК) в соответствии с ISO 20776-1 (2006 г.). Собственная антимикробная активность белка RihC определялась

двумя методами. Первый заключался в добавлении раствора белка в агаризованную среду Мюллера-Хинтона, второй – в методе микроразведений в соответствии с ISO 20776-1 (2006 г.), аналогично оценке МПК антибиотиков. Конечная концентрация в агаризованной среде составила 1,33 г/л. В жидкой среде при оценке антибактериальной активности максимальная концентрация белка составила 0,34 г/л.

Для оценки эффективности образования биоплёнок готовили взвесь изучаемого штамма в бульоне Мюллера-Хинтона с использованием Densi-La-Meter с оптической мутностью 1,0 McF ($3,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Далее проводили инокуляцию взвеси в лунки планшета по 180 мкл многоканальным дозатором, где на 1 штамм приходилось 12 повторов (4 ряда по 3 лунки). Отрицательным контролем служил бульон Мюллера-Хинтона, 12 повторов по 200 мкл. В изучаемые пробы добавляли в каждый ряд (в 3 повторах) по 20 мкл буферного раствора, в котором хранился фермент, раствора фермента RihC, физраствора (второй контроль) соответственно. Далее проводили инкубацию взвеси в планшете при 37°C в течение 2 суток, заклеивая парафильмом для предотвращения контаминации и засыхания среды. После окончания инкубации удаляли надосадочную жидкость с планктонной культурой вручную (дозатором или аспиратором со сменными наконечниками). Для оценки эффективности образования биоплёнок проделывали следующую процедуру. В лунки планшета вносили по 200 мкл отфильтрованного 0,1% раствора генциан фиолетового многоканальным дозатором. Инкубировали биоплёнки с красителем в течение 20 минут при комнатной температуре, затем удаляли из лунки краситель. Можно использовать разные методы промывки лунок, одним из которых является пипетирование (в данной работе использована 3-х кратная промывка дистиллированной водой при помощи многоканального дозатора). В рамках одного эксперимента необходимо использовать только один метод промывки. Планшеты переворачивали на фильтровальную бумагу и высушивали. После этого проводили экстракцию красителя: в лунки добавляли 96% раствор этанола в объёме 200 мкл и выдерживали 20 минут при комнатной температуре. В качестве растворителя для оптимизации результатов теста могут быть использованы и другие вещества в зависимости от изучаемой культуры. Далее растворитель отбирали, помещали в чистые плоскодонные планшеты и измеряли оптическую плотность при длине волны 580 нм. Результаты интерпретировали согласно оптической плотности окрашенного растворителя. Для полуколичественного определения биоплёнкообразующей способности штамма рассчитывали среднее значение оптической плотности 12 опытных лунок (ОПО_{ср}). Для отрицательного контроля рассчитывали значение по формуле $ОПК = ОПК_{ср} + 3 \cdot \sigma$ (от ОПК), где: ОПК – оптическая плотность контроля, ОПК_{ср} – среднее значение оптической

плотности контроля, σ – стандартное отклонение. Если $ОПК \sim ОПО_{ср}$, то способность штамма формировать биоплёнку отсутствует. Если $ОПК < ОПО_{ср} < 2*ОПК_{ср}$, то способность штамма формировать биоплёнку низкая. Если $2*ОПК < ОПО_{ср} < 4*ОПК$, то способность штамма формировать биоплёнку умеренная. Если $4*ОПК < ОПО_{ср}$, то способность штамма формировать биоплёнку высокая.

Синергизм фермента RihC на твёрдой питательной среде оценивали с препаратами цефтриаксон, цефтазидим, цефтазидим/авибактам, цефепим, азтреонам, эртапенем, меропенем, гентамицин, амикацин, тигециклин, колистин, ципрофлоксацин, биапенем, азтреонам/авибактам для изолята *K. pneumoniae*; с препаратами оксациллин, цефокситин, ципрофлоксацин, линезолид, эритромицин, клиндамицин, тигециклин, тетрациклин, ванкомицин, далбаванцин – для изолята *S. aureus*. Оценка синергизма проводилась следующим образом: в агаризованую среду Мюллера-Хинтона (Bio-Rad Laboratories, USA) вносили 10% от объёма (2 мл + 18 мл) тестируемого раствора белка RihC и в качестве контроля использовался буфер Tris-HCl, в котором этот белок хранится. На чашки Петри со средой Мюллера-Хинтона вместе с тестируемым белком проводили посев тестируемых изолятов аналогично посеву для оценки чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом. После посева на поверхность среды выкладывали диски с соответствующими антибиотиками. Сравнение зон задержки роста на двух вариантах питательных сред позволяет делать выводы о наличии или отсутствии синергизма.

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. 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* [4]. 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, поскольку её проводят с помощью металл-хелатной хроматографии, в ходе которой все примесные белки без His-tag не связываются с колонкой, а целевой белок связывается, после чего его можно элюировать с колонки, при этом белковый препарат получается в высокой степени чистоты. 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.

4.2. Моделирование структуры LreRihC

Структурное моделирование проводили с помощью бесплатной версии инструмента AlphaFold2 на базе Google Collab [196,197]. Модели строились с добавлением His-tag на N- или C-конец фермента с целью предположить, может ли His-tag повлиять на свойства фермента или нет и доступен ли он для связывания с колонкой в металл-хелатной хроматографии. 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. Известные структуры RihC представлены в таблице 8. Не приведены структуры одного и того же фермента с разными ингибиторами/лигандами, кроме этого, не приведены структуры мутантных ферментов, если для них есть структура фермента дикого типа.

Таблица 8 Решённые пространственные структуры RihC, имеющиеся в базе данных PDB. Сокращения, используемые далее в тексте, представлены в скобках. Наложение производилось на RihC из *Limosilactobacillus reuteri* LR1. * – исследуемый белок

Тип организма	Организм	PDB код	Разрешение, Å	RMSD, Å	Совпадение сиквенса, %	Процент наложенных остатков, %
Бактерии*	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> LR1(LreRihC)*	8QND	1,9	-	-	-
Бактерии	<i>Bacillus anthracis</i> (BanRihC)	2C40 (холо форма)	2,2	1,23	24	87
Бактерии	<i>Gardnerella vaginalis</i> 315-A (GvaRihC)	6BA1 (апо форма)	2,9	1,43	32	87
Растения	<i>Physcomitrella patens</i> (PpaRihC)	4KPN (апо форма)	3,35	1,17	32	83
Растения	<i>Zea mays</i> (ZmaRihC)	4KPO (апо форма)	2,49	1,12	33	87
Простейшие	<i>Crithidia fasciculata</i> (CfaRihC)	1MAS (апо форма)	2,5	1,02	34	91
		2MAS (холо форма)	2,3	1,06	34	91
Простейшие	<i>Leishmania braziliensis</i> (LbrRihC)	5TSQ (холо форма)	1,53	1,02	33	87
Простейшие	<i>Leishmania major</i> (LmaRihC)	1EZR (апо форма)	2,5	1,04	34	91

В связи с этим было проведено моделирование LreRihC с добавлением His-tag на N- или С-конец в виде гомодимера и гомотетрамера. Результаты моделирования представлены на рисунке 19.

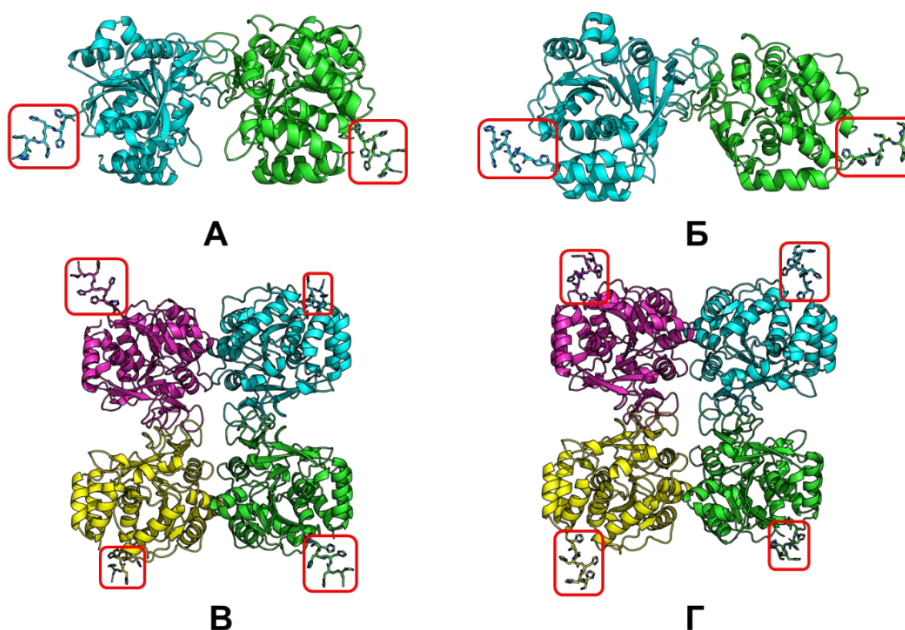


Рис.19. Модели димеров RihC_HisN (А) и RihC_HisC (Б) и тетрамеров RihC_HisN (В) и RihC_HisC (Г), построенные с помощью AlphaFold2. His-tag каждой субъединицы обведён красным

Из этого рисунка видно, что гистидиновые метки на N- и C-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 если обратить внимание на рисунок 19, 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 C-концы имеют более низкий процент совпадения и обычно их положение в пространстве предсказывается менее точно, нельзя однозначно сказать, что His-tag на C-конце будет строго негативно влиять на свойства LreRihC, поэтому было решено получить два варианта фермента LreRihC (с His-tag на N- и на C-конце) и сравнить их свойства.

4.3. Получение фермента LreRihC с His-tag

Генетические конструкции, содержащие ген RihC с His-tag на N- или C-конце, были получены согласно методике, представленной в соответствующем разделе экспериментальной части. Результаты секвенирования показали, что генетические конструкции содержат только ген RihC с целевой вставкой (His-tag на N- или C-конце фермента). Вектор pET-24a(+), выбранный для клонирования гена RihC из *L. reuteri*, представлен на рисунке 20.

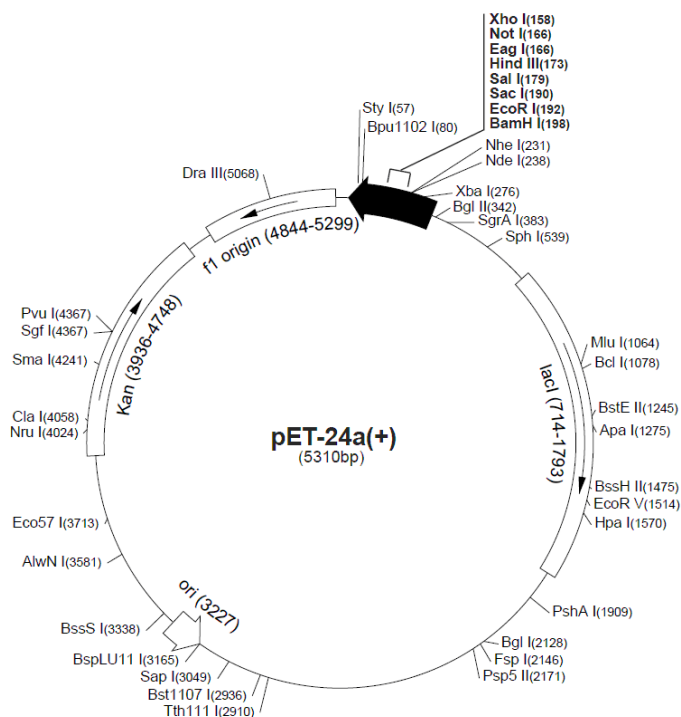


Рис.20. Вектор pET-24a(+), выбранный для клонирования гена RihC

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.

Экспрессию проводили по методике, описанной в соответствующем разделе экспериментальной части. В результате выяснили, 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, RihC_HisN получилось примерно в 3 раза больше, чем второй формы этого 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. Исходя из полученного результата экспрессии и из моделирования структур двух форм RihC, можно предположить, что расположение His-tag на С-конце, частично закрывающее активный центр белка, сказывается и на его фолдинге при синтезе в клетке.

Выделение и очистку фермента проводили, как описано в соответствующем разделе экспериментальной части. Степень чистоты подтверждали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях, результаты представлены на рисунке 21, а также с помощью тандемной MALDI-TOF масс-спектропии. Процент совпадения RihC после анализа MALDI с теоретической последовательностью составил 98% для обеих форм фермента. Из рисунка 21 видно, что оба фермента в результате очистки получились в водорастворимом 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 33,38 кДа, что также согласуется с полученными результатами SDS-PAGE для обеих форм белка.

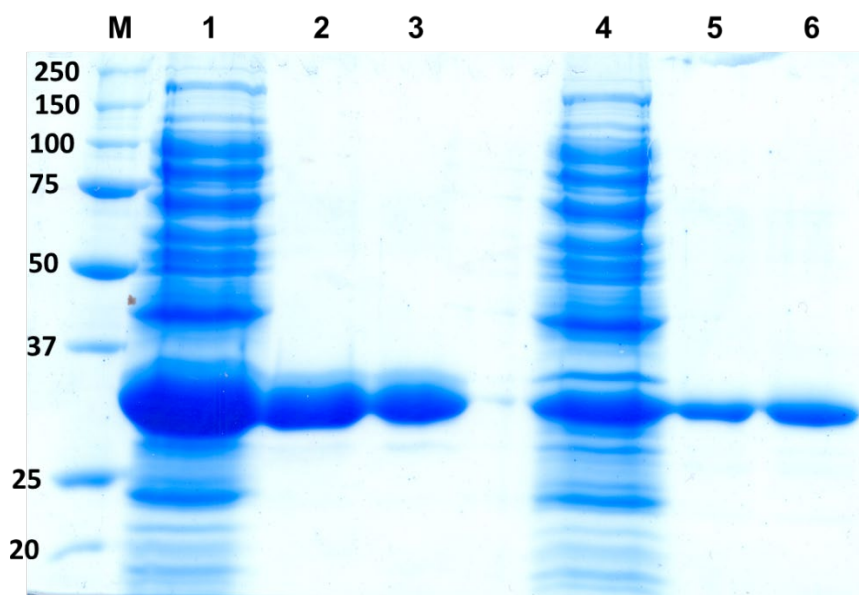


Рис.21. ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях для RihC_HisN и RihC_HisC. М - маркеры молекулярной массы, 1 - бесклеточный экстракт RihC_HisN после обработки УЗ, 2 - препарат RihC_HisN после проведения металл-хелатной хроматографии, 3 - препарат RihC_HisN после проведения гель-проникающей хроматографии, 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

4.4. Определение олигомерного состава фермента

Олигомерный состав RihC определяли с помощью аналитической гель-фильтрации. Калибровочная кривая с нанесённым на неё RihC_HisN представлена на рисунке 22. Для RihC_HisC в ходе данной работы были получены идентичные результаты, положение на графике накладывается на положение RihC_HisN. Теоретическая масса мономера RihC_HisN и RihC_HisC, рассчитанная с помощью аминокислотной последовательности, составляет 33,38 кДа. Молекулярная масса образцов RihC_HisN и RihC_HisC при гель-фильтрации составила 121 и 123 кДа соответственно, что соответствует тетрамеру. В работе [6] показали, что RihC из *E. coli* в растворе находится в виде димера. При этом нуклеозидгидролаза из *C. fasciculata* является тетрамером [119], а фермент из *Trypanosoma brucei brucei* является димером [117], 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.

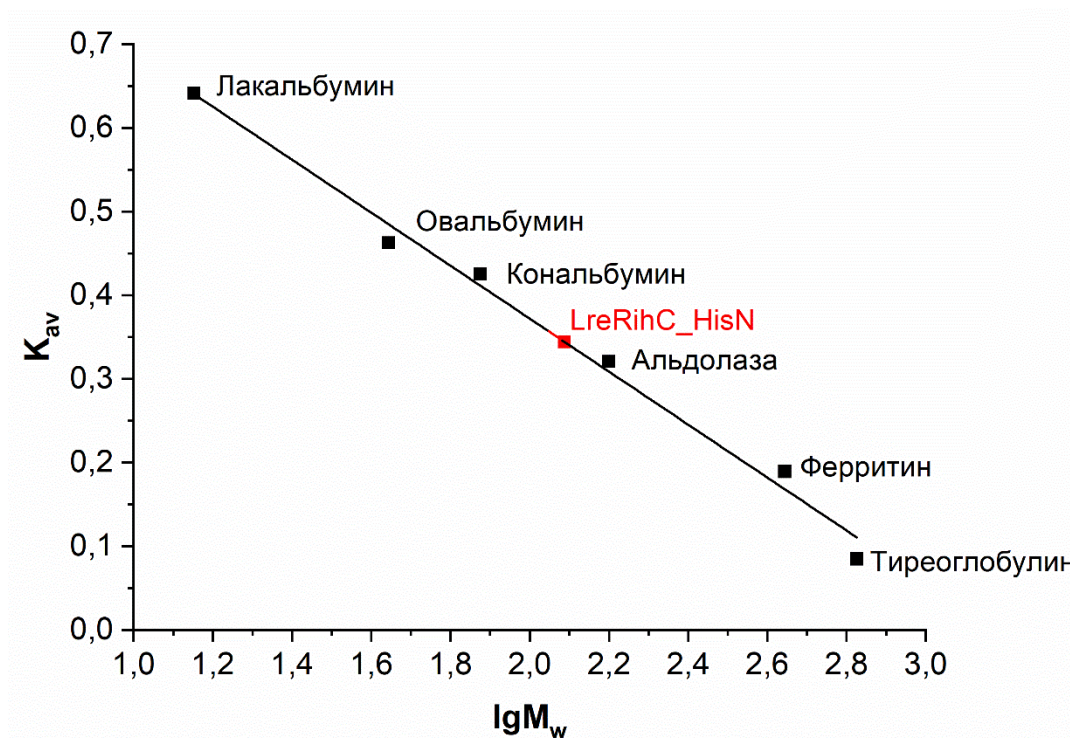


Рис.22. Градуировочная кривая аналитической гель-фильтрации. Красным отмечен целевой фермент RihC_HisN

4.5. Разработка методики определения активности RihC

Исходя из экспериментов работы [209], для разделения нуклеозидов и азотистых оснований использовали 20 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор (рН 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 урацила и уридина 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 23 представлены результаты серии из пяти анализов (по мере увеличения времени ферментативной реакции) с ферментом RihC с His-tag на С-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.

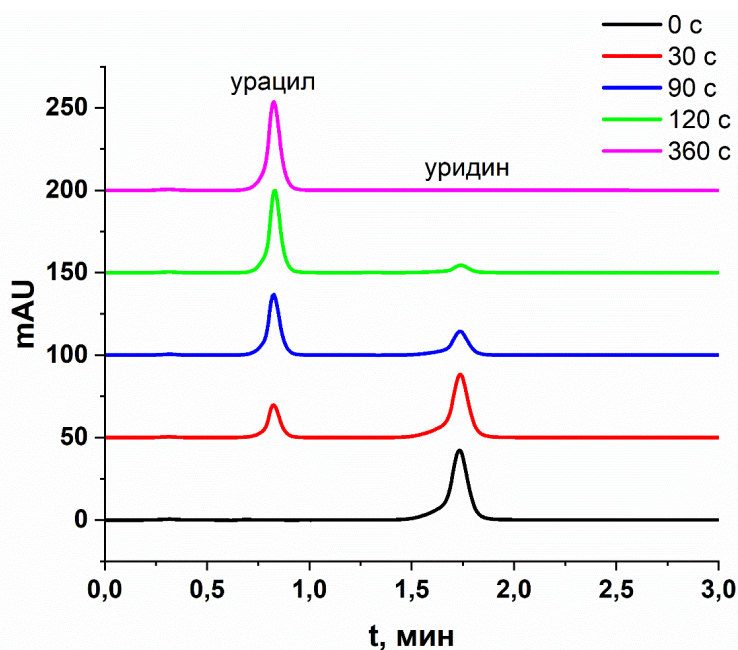


Рис.23. Серия хроматограмм после проведения ферментативной реакции с RihC с His-tag на С-конце. Разные цвета кривых соответствуют разным временам ферментативной реакции. Исходная концентрация уридина составляла 0,5 мМ.

Метрологические характеристики представлены в таблице 9. Для расчёта параметров ферментативной кинетики необходимо построить градуировочную зависимость по субстрату или продукту реакции, в данном случае был выбран продукт реакции урацил. Урацил показал хорошую линейную регрессию ($R^2 = 0.9993$) внутри исследуемого диапазона. Из данных видно, что данный метод является чувствительным для качественного и количественного определения аналита. На рисунке 24 представлен градуировочный график для урацила, использованный в дальнейшем для расчёта кинетических параметров ферментативной реакции RihC.

Таблица 9. Метрологические характеристики урацила для используемой в данной работе неподвижной фазы. * – Концентрация урацила в стандартном растворе для определения внутри- и межсуточной точности, ** – $y = ax+b$

Линейный диапазон, мМ	R^2	LOQ, мМ	LOD, мМ	Концентрация,* мМ	a^{**}	Внутрисуточная точность (%R.S.D. (n=5))	Межсуточная точность (%R.S.D. (n=5))
1,0 — 13	0,9993	1,0	0,15	5	0,807	1,3	2,5

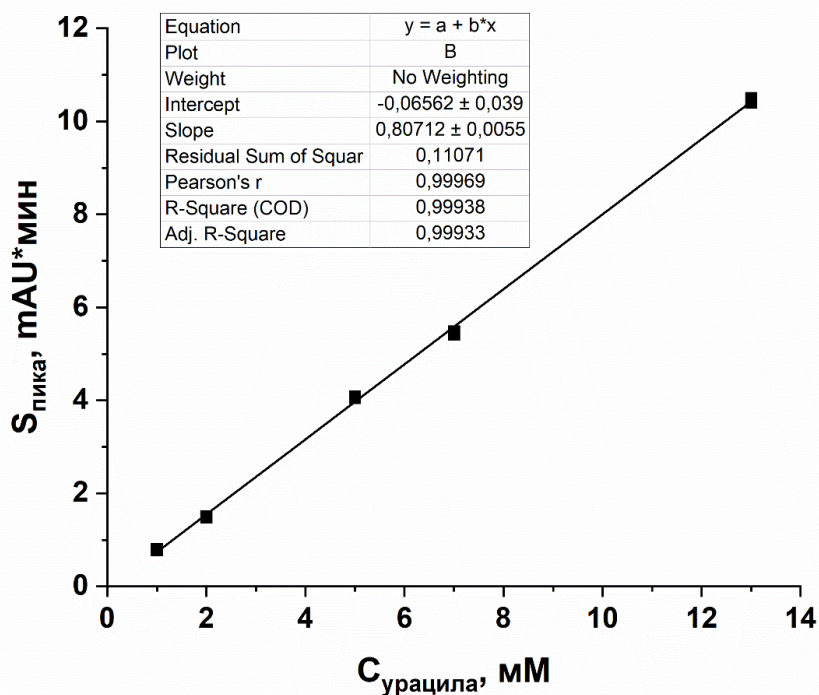


Рис.24. Градуировочная зависимость площади пика урацила от его концентрации

Важно отметить, что сорбенты такой структуры [200,201] 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. Эффективность по уридину для коммерческой колонки [210] составляет 20000 тт/м, а эффективность по уридину для коммерческой колонки [211] составляет примерно 5000 тт/м. 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, т.е. метод является универсальным.

Для дальнейших расчётов кинетических параметров, представленных в следующем разделе, каждое значение скорости было рассчитано из пяти усреднённых зависимостей площади пика урацила (т.е. концентрации урацила при использовании градуировочной зависимости, представленной на рисунке 24) от времени протекания ферментативной реакции, времена реакции составляли 5, 10, 15, 20 и 30 с для урацила (варьировались для других субстратов). Каждая усреднённая зависимость площади пика составлялась из трёх повторных анализов, т.е. 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. При этом если бы была использована лучшая коммерчески доступная колонка в режиме ГИХ, то время для построения одной зависимости скорости ферментативной реакции при идентичном количестве анализов составило бы 720 минут или 12 часов, а если использовать одну из коммерчески доступных колонок в обращённо-фазовом режиме, как это делали для исследования ферментативной кинетики RihC из *E. coli* [6], то при идентичном количестве анализов время составило бы 2400 минут или 40 часов непрерывных анализов. Для режима ГИХ по сравнению с коммерчески доступными колонками разница времени одного анализа составляет всего лишь одну минуту, однако при полном анализе ферментативной активности (т.е. для построения зависимости скорости реакции от концентрации субстрата) разница составляет 4 часа, что является значительным преимуществом колонки, использованной в данной работе. Обращённо-фазовый режим работы при этом показывает время в 5 раз большее, чем для колонки, использованной в данной работе, что является колоссальным преимуществом ГИХ в целом и данной колонки в частности. Помимо этого, эффективность колонки, использованной в данной работе, выше для уридина, чем в других коммерчески доступных колонках (30000 тт/м против 20000 тт/м для колонки из [210] и 5000 тт/м для колонки из [211]), что является важным преимуществом данной колонки. Более того, разработанная методика позволяет работать без дорогостоящего МС оборудования с использованием только УФ детектора, в отличие от имеющихся на данный момент работ в энзимологии [212–215], в которых используется ГИХ, что также является его большим преимуществом.

4.6. Кинетические параметры LreRihC

Измерения ферментативной активности проводились согласно методике, описанной выше. В качестве субстратов были выбраны четыре основных рибонуклеозида: уридин, цитидин, гуанозин, аденозин, а также инозин, ксантозин, 5-метилуридин, тимидин, 2'-дезоксирибоуридин и видарабин. 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 10. В этой таблице также представлены кинетические параметры других рибонуклеозидгидролаз. В качестве примера, на рисунке 25 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. Для уридина и цитидина удалось измерить ферментативную активность в диапазоне концентраций вплоть

до 100 мМ для обеих форм фермента, для аденозина – вплоть до 30 мМ (ввиду плохой растворимости этого субстрата при попытках получить более высокие концентрации в условиях, оптимальных для работы фермента), для инозина – вплоть до 20 мМ, для ксантозина – вплоть до 10 мМ. 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'-дезоксйридина не наблюдалось 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.

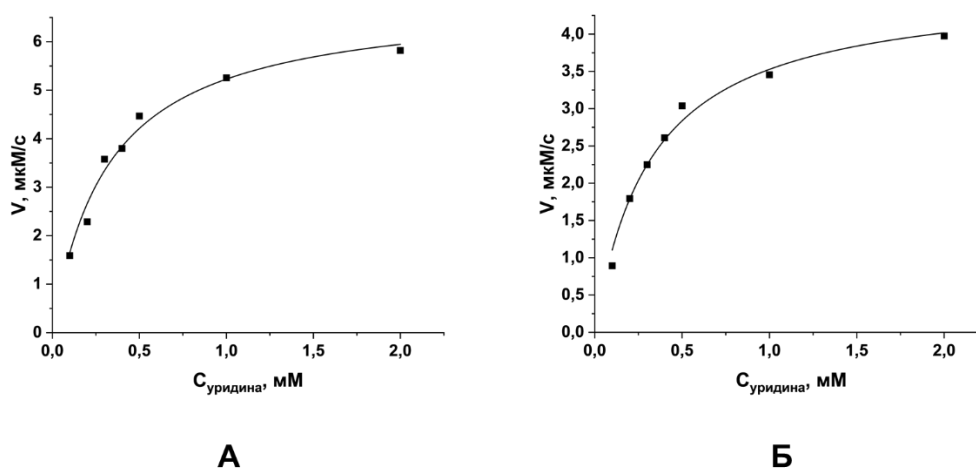


Рис.25. Зависимость скорости ферментативной реакции RihC_HisN (А) и RihC_HisC (Б) от концентрации уридина в диапазоне концентраций $0,5K_M-5K_M$

Для всех изученных субстратов для обеих форм фермента LreRihC при небольших концентрациях субстрата наблюдается классическая зависимость Михаэлиса-Ментен. Более того, полученные результаты не должны создать проблем с применением данного фермента, поскольку известно, что физиологическая концентрация нуклеозидов и азотистых оснований у человека в плазме крови и других внеклеточных жидкостях составляет 0,4-6 μM [216]. Внутриклеточные концентрации обычно выше. Точных данных по физиологическим концентрациям нуклеозидов у бактерий, к сожалению, нет, однако можно предположить, что они не должны сильно превышать концентрации этих веществ у человека.

Таблица 10 Кинетические параметры ферментов RihC в реакции с разными субстратами

Фермент	k_{cat} уридин, с ⁻¹	K_M уридин, мкМ	k_{cat} цитидин, с ⁻¹	K_M цитидин, мкМ	k_{cat} инозин, с ⁻¹	K_M инозин, мкМ	k_{cat} ксантозин, с ⁻¹	K_M ксантозин, мкМ	k_{cat} аденозин, с ⁻¹	K_M аденозин, мкМ	k_{cat} гуанозин, с ⁻¹	K_M гуанозин, мкМ	Работа
LreRihC HisN	167±6	320±40	112±4	680±80	30±5	2500±600	57±8	1200±200	118±4	420±50	нд	нд	Настоящая работа
LreRihC HisC	134±6	320±40	58±6	620±60	18±6	2600±600	40±6	1300±200	65±7	480±90	нд	нд	Настоящая работа
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	[6]
CfaRihC	143	1220±40	20	4700±500	32	380±30	нд	нд	4,3	460±30	2	420±10	[119,122]
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	[176]
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	[122]

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

Из данных таблицы 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). В целом, такие высокие значения каталитических констант могут свидетельствовать о роли этого фермента в ответе лактобактериями на присутствие клебсиелл.

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 26.

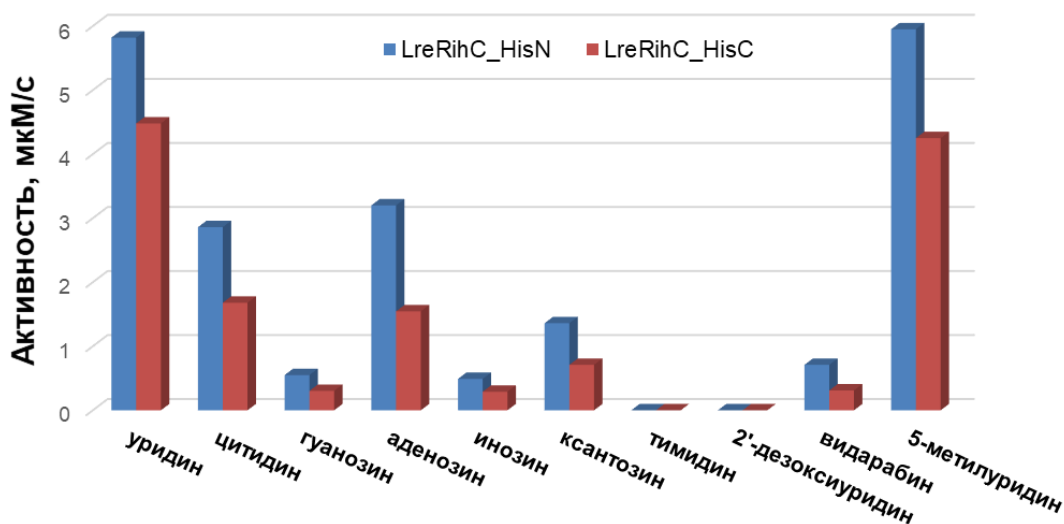


Рис.26. Активность двух форм LreRihC с 2 мМ соответствующего субстрата

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.

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 CaCl₂. Указанные вещества были добавлены в пробы фермента, которые затем инкубировали сутки при 4°C и ставили ферментативную реакцию с уридином (рисунок 27).

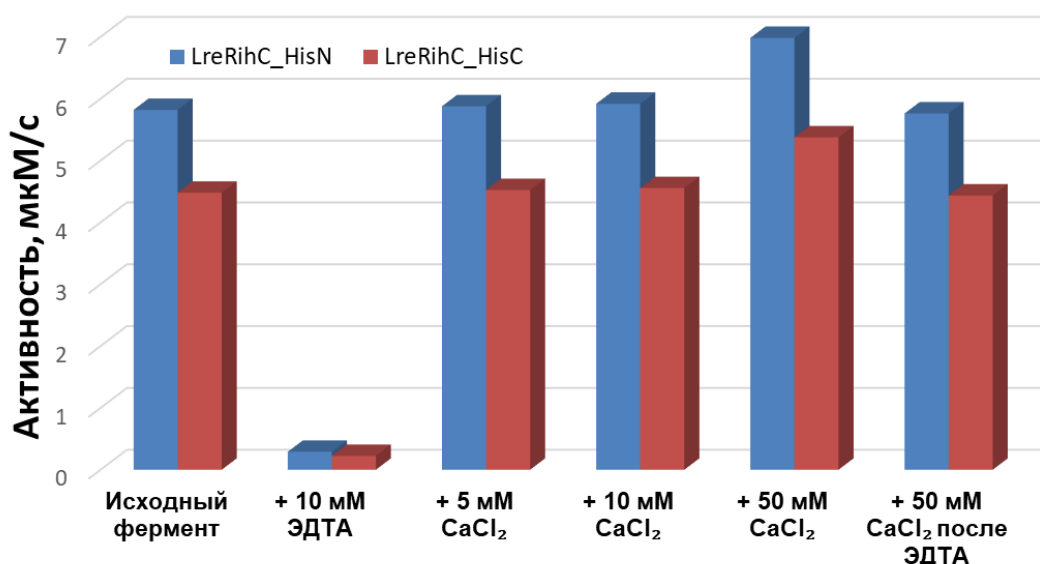


Рис.27. Активность двух форм LreRihC с 2 мМ уридина после инкубации фермента с ионами кальция или ЭДТА в различных концентрациях

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 CaCl₂ 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 небольшое возрастание 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.

4.7. 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 28 А.

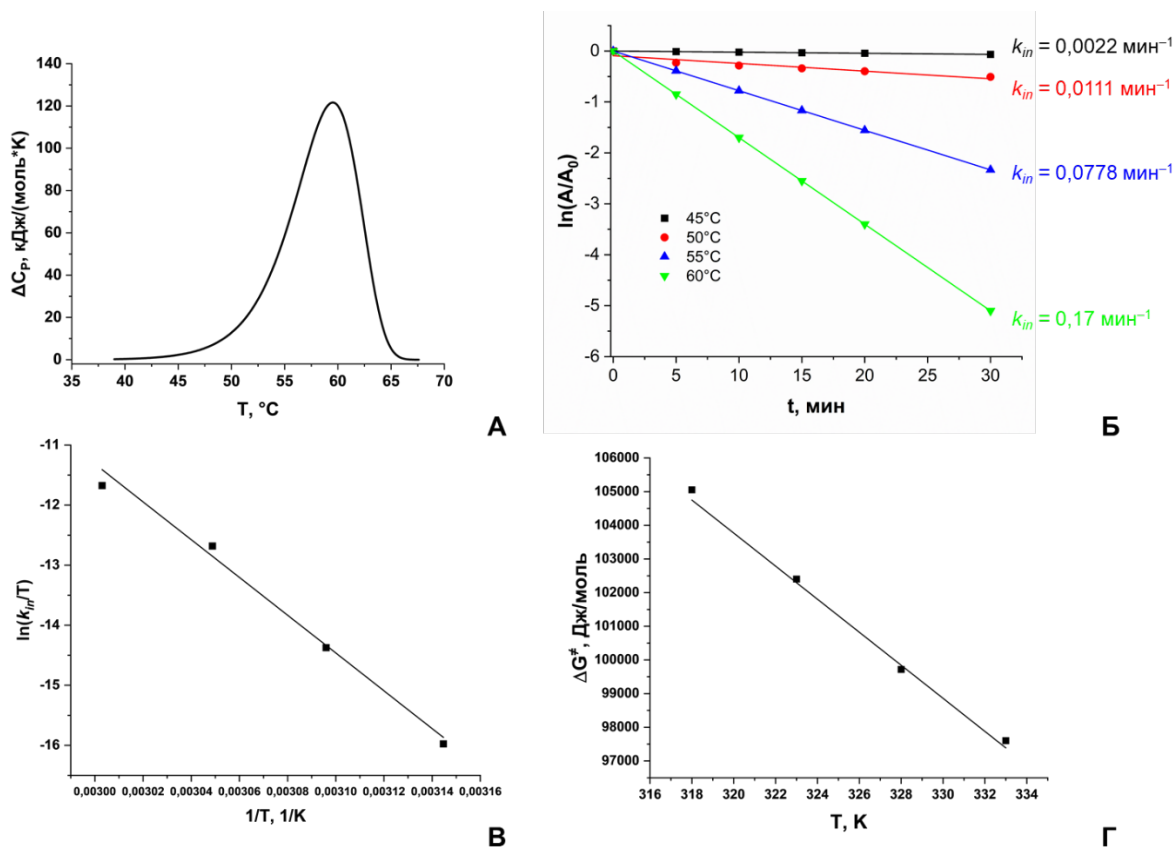


Рис.28. (А) Кривая ДСК для RihC_HisN, (Б) зависимость остаточной активности LreRihC_HisN от времени инкубирования при разных температурах в реакции с 30 мМ уридином, (В) график расчёта параметра ΔH^\ddagger термоинактивации фермента, (Г) график расчёта параметра ΔS^\ddagger термоинактивации фермента

Из рисунка видно, что T_m для данного фермента составляет 59,5°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°C, основываясь на данных ДСК. Зависимости остаточной активности фермента от времени инкубации представлены в полулогарифмических координатах на рисунке 28 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 0,1М NaPB pH 7,0. При температуре 60°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 ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger (рисунок 28 В и Г), а также параметр T_{20} (температура, при которой активность фермента падает в 2 раза за 20 минут). Параметр ΔH^\ddagger составил 260 ± 30 кДж/моль, параметр ΔS^\ddagger составил 490 ± 90 Дж/(моль*К), а параметр $T_{20} - 53,7^\circ\text{C}$.

В целом, кинетика термоинактивации хорошо согласуется с результатами ДСК. Можно увидеть, что при 45°C белок ещё стабильный и имеет небольшую константу скорости термоинактивации, что соответствует началу пика ДСК, при 50°C константа инактивации становится выше, но не на значительную величину, и на ДСК видно, что эта температура всё ещё соответствует началу пика, а при 55°C и 60°C константы инактивации резко возрастают, что соответствует максимуму пика ДСК.

4.8. 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 $1,9 \text{ \AA}$. В асимметричной кристаллической ячейке присутствует четыре почти идентичных субъединицы (RMSD между субъединицами не превышает $0,13 \text{ \AA}$), сама ячейка соответствует пространственной группе $P12_11$. Анализ контактов показал, что белок является тетрамером в кристалле (рисунок 29 А), что согласуется с исследованием олигомерного состояния в растворе. Структурное сравнение LreRihC с известными структурами RihC из других организмов (таблица 11, рисунок 29) показало, что упаковка похожа на фермент LmaRihC из простейшего, который тоже является тетрамером (рисунок 29 Б), тогда как бактериальная GvaRihC и растительная ZmaRihC являются димерами (рисунок 29 В, Г). Несмотря на это, тетрамер LreRihC организован иначе, чем тетрамер LmaRihC, что означает различные внутрисубъединичные взаимодействия (рисунок 29 А, Б). В таблице 11 для удобства представлены все сокращённые названия RihC из различных организмов, которые используются далее.

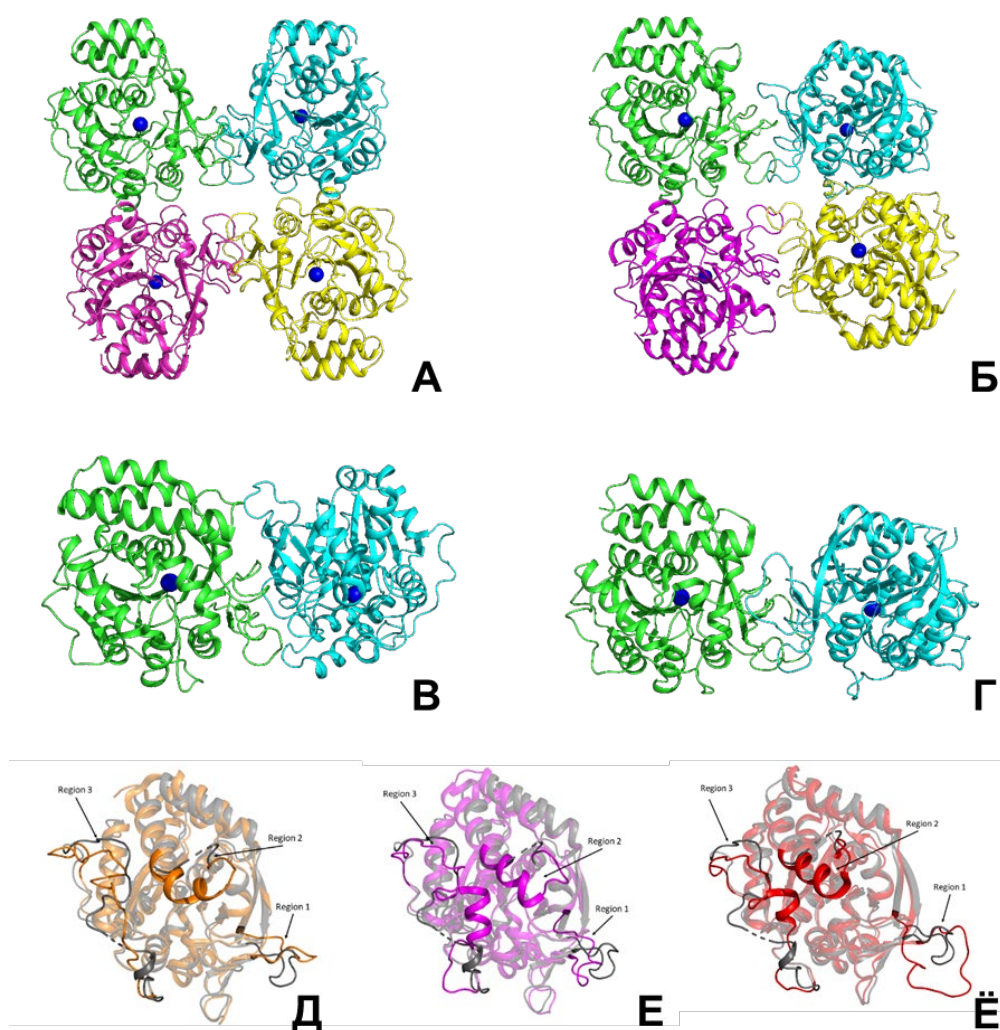


Рис.29. Сравнение кристаллических структур RihC. Функциональные тетрамеры LreRihC (А) и LmaRihC (Б), а также функциональные димеры GvaRihC (В) и ZmaRihC (Г) (таблица 11). Зелёные субъединицы представлены в одинаковой ориентации. Ионы Ca^{2+} показаны синими сферами. Наложение субъединиц LreRihC (серая) с LmaRihC (оранжевая, Д), GvaRihC (сиреневая, Е) и ZmaRihC (красная, Ё). Хорошо наложенные регионы показаны полупрозрачными

Таблица 11 Список сокращённых названий RihC

Тип организма	Организм	Сокращённое название гидролазы
Бактерии	<i>Bacillus anthracis</i>	BanRihC
Бактерии	<i>Escherichia coli</i>	EcoRihC
Бактерии	<i>Gardnerella vaginalis</i> 315-A	GvaRihC
Бактерии	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> LR1	LreRihC
Бактерии	<i>Salmonella enterica</i>	SenRihC
Растения	<i>Physcomitrella patens</i>	PpaRihC
Растения	<i>Zea mays</i>	ZmaRihC
Простейшие	<i>Crithidia fasciculata</i>	CfaRihC
Простейшие	<i>Leishmania braziliensis</i>	LbrRihC
Простейшие	<i>Leishmania major</i>	LmaRihC

Сравнение субъединиц показало, что все структуры имеют схожую укладку. Однако гидролаза LreRihC больше всего похожа на ферменты простейших LmaRihC, LbrRihC и CfaRihC с наименьшей схожестью к бактериальным GvaRihC и BanRihC (таблица 8). В структуре также присутствует три участка полипептидной цепи, плохо накладывающиеся на известные структуры и дающие высокие значения RMSD. Участок 1 (Region 1 на рис.29; остатки 272–283 в LreRihC) во всех структурах является гибким неупорядоченным участком с разными конформациями (рисунок 29 Д–Ё). Участок 2 (Region 2 на рис.29; остатки 226–234) не структурирован в LreRihC и BanRihC, в отличие от других RihC (таблица 8), в которых он представляет собой α -спираль. Участок 3 (Region 3 на рис.29; остатки 77–99) в LreRihC и LmaRihC также является не структурированным (рисунок 29 Д), тогда как в GvaRihC и ZmaRihC этот участок содержит одну α -спираль (рисунок 29 Е, Ё).

Субъединица LreRihC имеет типичную α/β упаковку, состоящую из 11 связанных β -тяжей, окружённых α -спиралями. Активный центр LreRihC образован остатками D16, D20, D21, N45, T128, N162, E168, N170, H237 и D238. Каждая субъединица содержит один ион Ca^{2+} в активном центре, координируемый карбоксилатами трёх консервативных остатков аспартата (D16, D21 и D238), кислородом основной цепи остатка T128 и тремя молекулами воды (рисунок 30 А). Наложение субъединицы LreRihC и апо форм известных RihC (таблица 8) показало схожую координацию иона кальция (рисунок 30). Отсутствие молекул растворителя, координирующих ионы кальция, в некоторых структурах (GvaRihC, ZmaRihC и LmaRihC) (рисунок 30 Б–Г), скорее всего, является результатом относительно низкого разрешения. Следует также отметить, что в ZmaRihC вместо остатка треонина (128) находится остаток лейцина (123), координирующего ион кальция таким же образом, что не влияет на общую координацию кальция в структуре (рисунок 30 В).

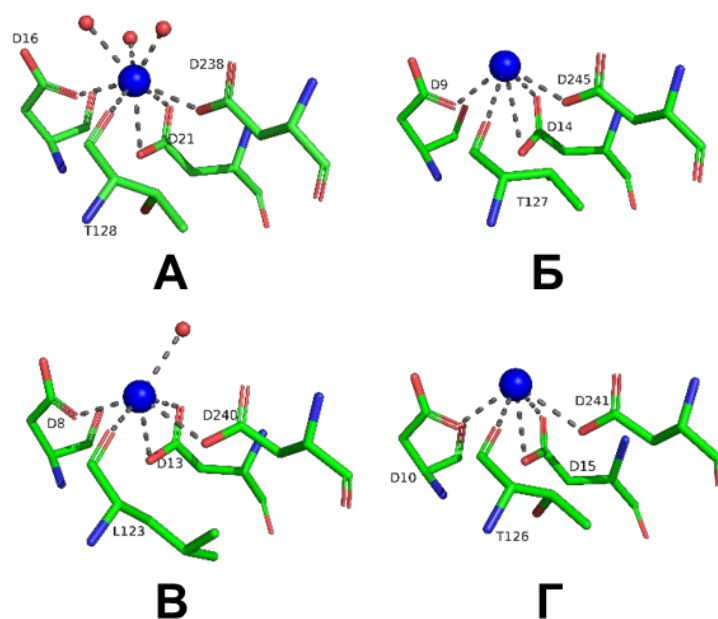


Рис.30. Координация (серые пунктирные линии) иона Ca^{2+} (синие сферы) в активных центрах LreRihC (А), GvaRihC (Б), ZmaRihC (В) и LmaRihC (Г)

Для описания возможного механизма связывания субстрата в LreRihC активный центр этого фермента далее сравнили с активным центром холо формы бактериальной BanRihC в комплексе с α -D-рибофуранозой (таблица 8, рисунок 31 А, Б). Анализ наложения показал схожее окружение полости связывания рибозы, образованное D21 (D14 в BanRihC), T128 (T125), N162 (N160), E168 (E171), N170 (N173) и D238 (D247). Стоит отметить, что боковые группы D20 и N45 в LreRihC ориентированы от субстрат-связывающей области (рисунок 31 А), в сравнении с холо формой BanRihC, где боковые группы соответствующих остатков D13 и D38 могут принимать участие в координации субстрата (рисунок 31 Б, оранжевые пунктирные линии). Дальнейшее сравнение структуры LreRihC с CfaRihC из простейшего в холо форме (таблица 8) показало, что в данном случае соответствующие остатки D14 и N39 (D20 и N45 в LreRihC) тоже участвуют в связывании кольца рибозы (рисунок 31 В). Однако в апо форме CfaRihC (рисунок 31 Г) D14 образует солевой мостик с H241, а N39 ориентирован от активного центра, что похоже на апо форму LreRihC.

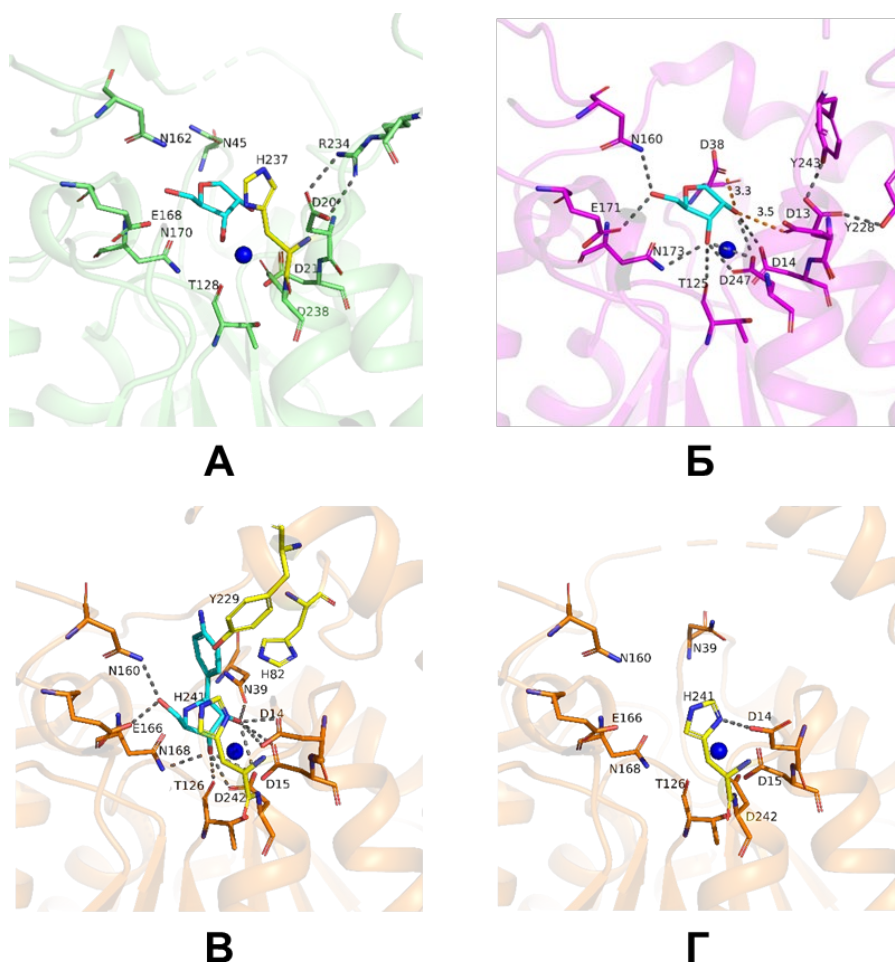


Рис.31. Активный центр LreRihC (показан зелёным, А) и BanRihC (показан сиреневым, Б). Лиганд из структуры BanRihC показан голубым на обеих панелях. Активные центры CfaRihC в комплексе с ингибитором pAPIR (ингибитор показан голубым, В) и в виде апо формы (Г) показаны оранжевым в одинаковой ориентации. 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

В CfaRihC остатки H82, Y229 и H241 являются единственными остатками, координирующими азотистое основание субстрата [119]. В случае LreRihC остаток H237 (H241 в CfaRihC) находится в похожей ориентации (рисунок 31 А, В), однако остатки H86 и Y226 (H82 и Y229 в CfaRihC) расположены на подвижных участках 3 и 2 соответственно (рисунок 29 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.

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 32 А).

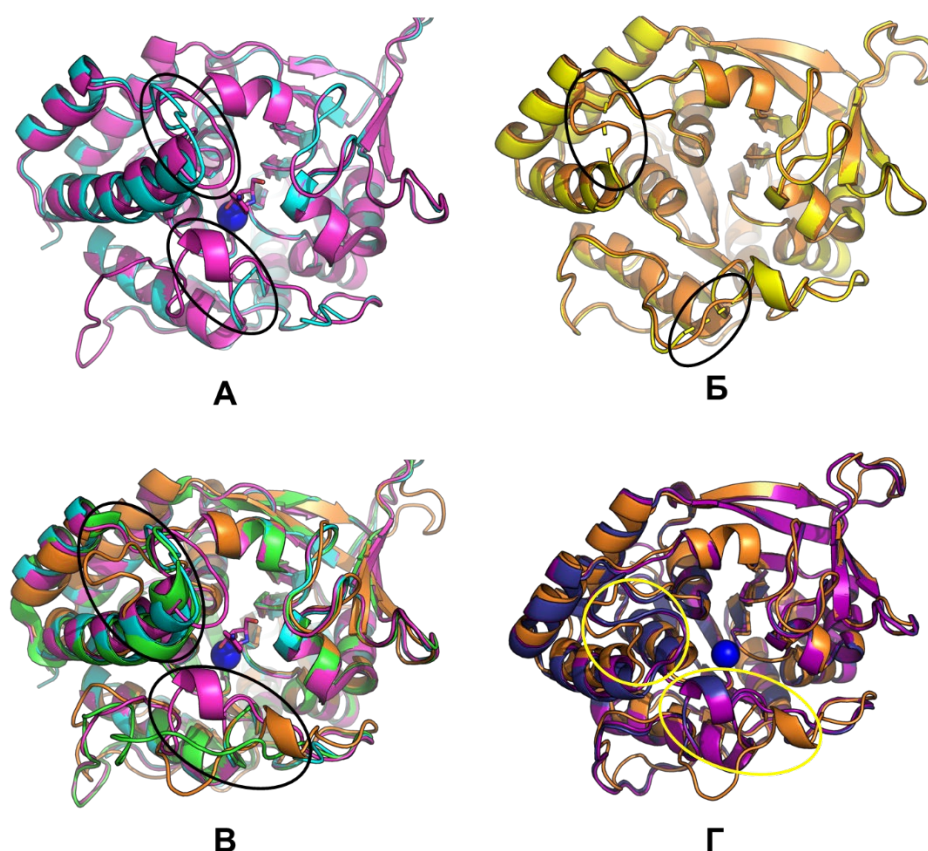


Рис.32. (А) Сравнение кристаллических структур CfaRihC 1MAS (голубой цвет) и 2MAS (сиреневый цвет), (Б) сравнение кристаллической (жёлтый цвет) и модельной (оранжевый цвет) структур LreRihC с разрешёнными участками в модели, (В) сравнение модели LreRihC, кристаллических структур CfaRihC (1MAS и 2MAS) 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 29) и 75–85 (часть Участка 3, как обсуждалось для рисунка 29) 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)

Из рисунка 32 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 32 Б. Из этой же панели видно, что новые разрешённые участки, по всей видимости, 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) α -спираль (рисунок 32 В). И CfaRihC, и LmaRihC были выбраны, поскольку для обоих ферментов есть известные кинетические параметры. Участок 3 (нижний овал на рисунке 32 В) также имеет некоторые различия среди разных структур, но из всех структур он значительно ближе к активному центру только в 2MAS. И хотя это может быть интересным с точки зрения конформационных изменений RihC при катализе, это не объясняет различия в кинетических параметрах различных RihC (таблица 10), тогда как разница в Участке 2 (верхний овал на рисунке 32 В) может это объяснить.

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 решённой кристаллической структуры) и исследуемый фермент LreRihC. Выравнивание показано на рисунке 33. В качестве матрицы совпадений использовали Blosum62.



Рис.33. Аминокислотное выравнивание различных гидролаз RihC. Все выбранные ферменты имеют изученные кинетические параметры, представленные в таблице 10. Цветами отмечены остатки с определённым процентом совпадения: зелёным – $\geq 90\%$ совпадения, жёлтым – 80-90%, оранжевым – 60-80%

Участок, который, как мы полагаем, может объяснить различия в кинетических параметрах этих ферментов, расположен в районе остатков 220–235 в выравнивании (нумерация по SenRihC), где 226 – это позиция, после которой в LreRihC α -спираль переходит в неупорядоченный участок, но в CfaRihC и LmaRihC α -спираль продолжается, делая этот элемент структуры более жёстким. Это видно и на выравнивании, поскольку у CfaRihC и LmaRihC в этом регионе находится больше остатков, образующих удлинённую α -спираль. Стоит отметить, что в этом плане EcoRihC и SenRihC похожи на LreRihC и поэтому тоже должны иметь в своей структуре более короткую α -спираль с неупорядоченным участком за ней в этом регионе. Это является интересным фактом, поскольку в плане значений k_{cat} LreRihC больше похожа на CfaRihC из простейших, но в плане значений K_M она больше похожа на бактериальную EcoRihC (исключениями являются инозин и ксантозин, являющиеся предпочтительными для EcoRihC и неpreferируемыми для LreRihC). В связи с этим, было решено провести моделирование структур EcoRihC и SenRihC, используя AlphaFold2, и сравнить получившиеся модели с нашей моделью (рисунок 32 Г). Два интересующих участка обведены жёлтыми овалами. И хотя остатки 220–240 (верхний овал) действительно образуют короткую α -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 (а если быть точнее, то к участку, связывающему азотистое основание), 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. Возможное объяснение может быть следующее: структура нашего фермента может быть более подвижна, чем EcoRihC и SenRihC (Участок 3 находится несколько дальше от активного центра в LreRihC), 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 предпочтительных для LreRihC субстратов в сравнении с другими гидролазами RihC. Что касается того факта, что инозин и ксантозин являются для нашего фермента наименее предпочтительными по сравнению с другими ферментами, хотя нельзя сказать с полной уверенностью, мы предполагаем, что кето-группа в положении 6 нуклеотида (в связи с чем инозин, гуанозин и ксантозин также называют 6-оксопуринами) может хуже стабилизироваться в активном центре, чем аминогруппа в том же положении в аденозине, из-за чего инозин и ксантозин (и, судя по данным активности фермента с 2 мМ различных

субстратов, гуанозин тоже) являются наименее предпочтительными субстратами для LreRihC.

4.9. 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 RihC 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. *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter cloacae* тестировались на чувствительность к следующим препаратам: ампициллин, цефепим, цефепим/сульбактам, цефтазидим, цефтазидим/авибактам, азтреонам, азтреонам/авибактам, имипенем, меропенем, биापенем, гентамицин, амикацин, тигециклин, колистин, цiproфлоксацин, триметоприм-сульфометаксозол, хлорамфеникол, цефоперазон/сульбактам, перациллин/тазобактам. Полученные данные о значениях МПК свидетельствуют о 100% устойчивости к ампициллину, к которому природная резистентность есть только у *K. pneumoniae*. К цефепиму, цефепиму/сульбактаму и цефтазидиму сохраняется чувствительность у двух изолятов *E. coli*. Добавление к цефтазидиму ингибитора сериновых бета-лактамаз приводит к появлению чувствительности у 6 изолятов, что косвенно говорит о наличии у них металло-бета-лактамаз. Пять изолятов из тридцати пяти сохраняют чувствительность к имипенему и примерно аналогичные результаты по другим двум карбапенемам – меропенему и биапенему. На примере амикацина и гентамицина можно проследить отсутствие у этих препаратов ассоциированной устойчивости и широкое распространение устойчивости к ним. Тигециклин и колистин сохраняют наибольшую активность по отношению к собранным изолятам, хотя к колистину устойчивы один изолят *E. coli* и один изолят *P. aeruginosa*. К цiproфлоксацину чувствительны только четыре изолята, триметоприм-сульфаметоксозолу – шесть изолятов. К хлорамфениколу чувствителен один изолят, к цефоперазону/сульбактаму чувствительность сохраняет 4 изолята. К пиперациллину/тазобактаму чувствительность сохраняется только у двух изолятов *E. coli*. Изоляты *A. baumannii* и *S. aureus* тестировались на чувствительность к следующим

антибиотикам: имипенем, меропенем, гентамицин, амикацин, тигециклин, доксициклин, колистин, цiproфлоксацин, триметоприм/сульфаметоксозол, пиперациллин/тазобактам. На полученных данных МПК можно сделать вывод о наибольшей чувствительности этих изолятов по отношению к колистину, доксициклину, тигециклину, в остальном профиль антибиотикорезистентности соответствует представлениям о множественной резистентности к антибиотикам. Изоляты *E. faecium* тестировались на чувствительность к следующим антимикробным препаратам: ванкомицин, ампициллин, тигециклин, левофлоксацин, цiproфлоксацин, линезолид, даптомицин, оритаванцин, далбаванцин, телаванцин, тейкопланин. Анализ данных МПК этих изолятов показал множественную резистентность к антибиотикам у большинства изолятов. 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 происходило десятикратное разведение исходных белковых препаратов и конечные концентрации составили 1,33 г/л. Протестировано 35 изолятов, ингибирования роста изолятов не выявлено. Пример роста изолятов на чашке Петри представлен на рисунке 34.

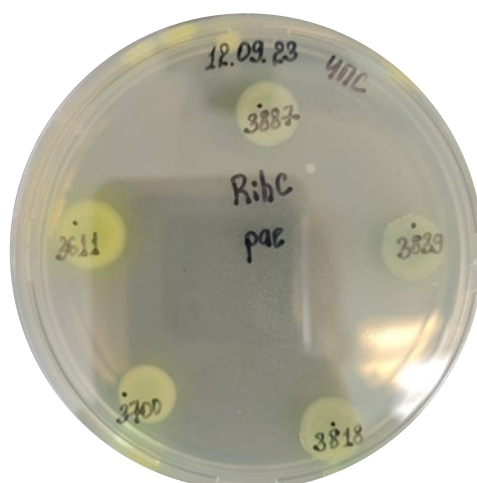


Рис.34. Пример роста изолятов *P. aeruginosa* на агаризованной среде с добавлением тестируемого белка LreRihC

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 собственной антибактериальной активности методом добавления препаратов в агаризованную твёрдую среду, антибактериальная активность не обнаружена (наблюдался рост тестируемых бактерий во всех лунках планшета за исключением лунок отрицательного контроля).

Так как у тестируемых препаратов не было выявлено антибактериальной активности, то есть кинетика отмирания была отрицательна, для оценки динамики изменения плотности клеток в результате добавления в среду комбинации белкового препарата и антибиотиков основных классов был использован планшетный спектрофотометр с функцией поддержания заданной температуры, перемешивания и считывания оптической плотности при длине волны 600 нм. Практически все такие эксперименты с патогенами ESKAPE показали отсутствие синергизма фермента LreRihC с известными антибиотиками (т.е. отсутствие влияния на рост бактерий в среде в комбинации с этими антибиотиками по сравнению с пробами без исследуемого фермента, но с антибиотиками), однако были исключения (рисунок 35).

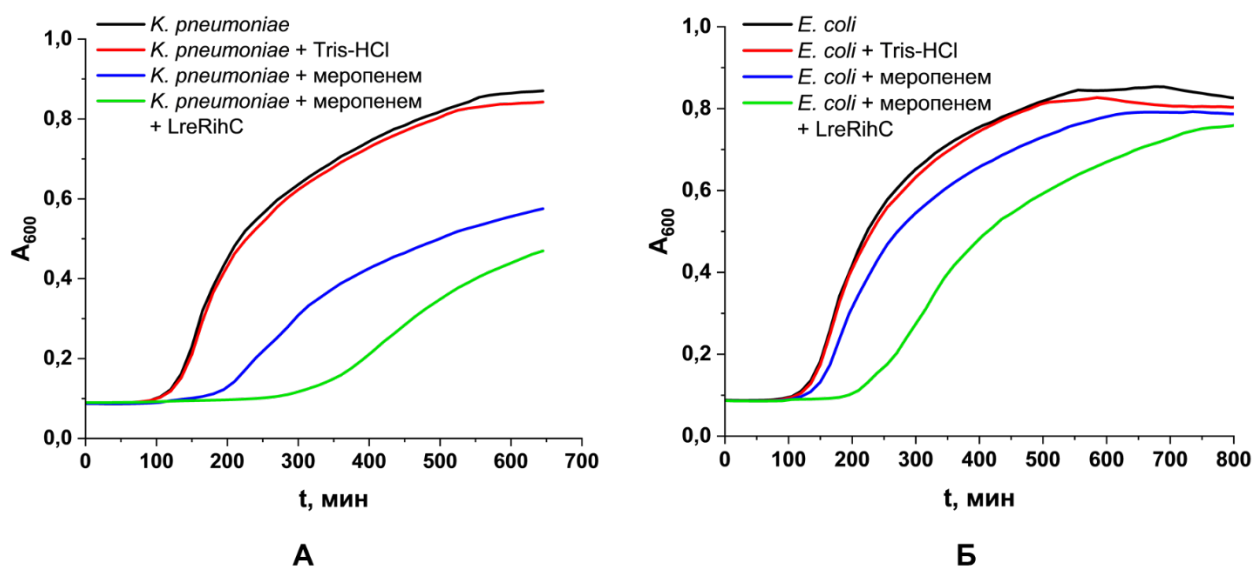


Рис.35. Кривые роста изолятов *K. pneumoniae* (А) и *E. coli* (Б) в присутствии меропенема и фермента LreRihC

Белок LreRihC показал наличие синергизма с меропенемом (концентрация меропенема 16 мг/л, концентрация белка 1,33 г/л) при воздействии на *K. pneumoniae* (рисунок 35 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; рисунок 35 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.

Оценка синергизма фермента LreRihC с антибиотиками основных классов против патогенов *K. pneumoniae* и *S. aureus* была дополнительно проведена с помощью модифицированного диско-диффузионного метода. Результаты эксперимента приведены на рисунке 36.

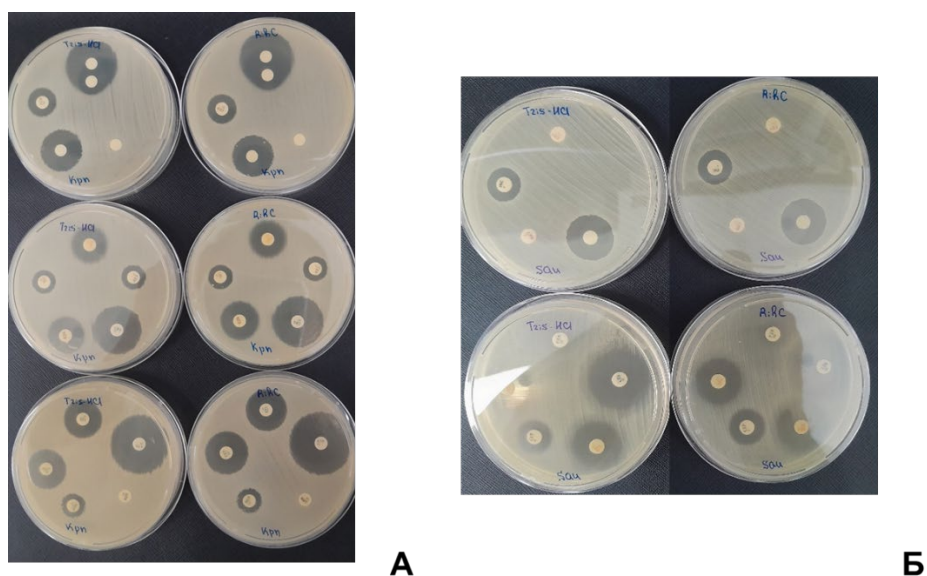


Рис.36. Фотография чашек Петри с газоном *K. pneumoniae* (А) и *S. aureus* (Б) с добавлением на дисках антибиотиков основных классов на двух вариантах сред: с добавлением белка LreRihC (ряд справа) и с добавлением буфера Tris-HCl в качестве контроля (ряд слева)

Как видно из рисунка, зоны задержки роста всех протестированных антибактериальных препаратов для обоих организмов идентичны между собой, какие-либо эффекты при добавлении фермента в среду не обнаружены.

Пример результатов оценки биоплёнкообразования представлен в таблице 12. В качестве положительного контроля выступал сам изолят без добавления других веществ, в

качестве отрицательного контроля выступала стерильная питательная среда, в которой выращивается микроорганизм. 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 виде качественных выводов внизу таблицы. В сумме эффективность биоплёнкообразования собственная и при добавлении тестируемого белка была оценена для 20 изолятов различных микроорганизмов.

Таблица 12 Результаты оценки биоплёнкообразования изолята *K. pneumoniae* 1989 под воздействием тестируемого фермента LreRihC

	Буфер Tris-HCl	LreRihC	Положительный контроль	Отрицательный контроль
ОПО1	1,49	0,33	2,08	0,13
ОПО2	1,41	0,63	1,23	0,13
ОПО3	1,55	0,63	1,61	0,13
ОПОср	1,48	0,53	1,64	0,13
σ				0,0012
ОПК				0,13
Вывод о способности к биоплёнкообразованию	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 клебсиеллы.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведённых исследований впервые получен рекомбинантный фермент RihC из бактерий *L. reuteri* LR1. Фермент получен в виде двух форм с добавлением His-tag для упрощения и ускорения очистки на N- или C-конец фермента. При экспрессии в рекомбинантной системе *E. coli* оказалось, что фермент с His-tag на N-конце синтезируется в 3 раза в большем количестве по сравнению с ферментом с His-tag на C-конце.

Для оптимизации изучения ферментативной активности и кинетических параметров RihC была разработана новая экспрессная эффективная методика с использованием гидрофильной хроматографии. Подобранные неподвижные фазы и условия проведения хроматографического анализа позволили сократить время этого анализа в 5 раз по сравнению с методикой, описанной в литературе, не уступая при этом в эффективности при разделении пар нуклеозид - азотистое основание для всех изученных субстратов. Помимо этого, разработанная методика является универсальной и может применяться для подобного анализа других ферментов семейства Rih. Константы Михаэлиса для фермента RihC из *L. reuteri* хорошо согласуются с литературными данными для RihC из других источников, каталитические константы для данного фермента являются высокими даже для наименее предпочтительных субстратов, при этом для фермента с His-tag на N-конце эти значения выше, чем для второй формы фермента. С помощью этой методики была также определена кинетика термоинактивации фермента и показана роль иона кальция в катализе RihC. Данные термостабильности, определённые с помощью изучения кинетики термоинактивации, хорошо согласуются с данными, полученными в ходе дифференциальной сканирующей калориметрии, и указывают на необратимую одностадийную инактивацию при повышенных температурах.

Помимо этого, для данного фермента были получены кристаллы и решена пространственная структура с разрешением 1,9 Å с помощью рентгеноструктурного анализа. Показано, что фермент существует в виде тетрамера и что в каждой субъединице в каталитическом центре присутствует ион кальция. Определены каталитически важные аминокислотные остатки этого фермента.

Исследования, проведённые для фермента RihC из *L. reuteri* на патогенах группы ESKAPE с множественной устойчивостью к антибиотикам показали, что собственной антибактериальной активностью фермент не обладает и не подавляет рост этих микроорганизмов ни в жидкой, ни на агаризованной среде, однако обладает синергизмом с меропенемом в жидкой питательной среде против некоторых штаммов *E. coli* и *K.*

pneumoniae, замедляя рост этих бактерий. Помимо этого, данный фермент снижает эффективность образования биоплёнок для некоторых штаммов *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* и *P. aeruginosa*.

VI. 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*.

VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wyres K.L. et al. Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia // *Genome Med.* 2020. Vol. 12, № 1. P. 11.
2. Nirwati H. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia // *BMC Proc.* 2019. Vol. 13, № S11. P. 20.
3. Kochish A.A. et al. Experimental study of antimicrobial polymeric composition with hemostatic effect in treatment of implant associated infection // *Genij Ortopedii.* 2019. Vol. 25, № 2. P. 180–187.
4. Savinova O.S. et al. Exoproteome analysis of antagonistic interactions between the probiotic bacteria *limosilactobacillus reuteri* lrl and *lacticaseibacillus rhamnosus* f and multidrug resistant strain of *klebsiella pneumonia* // *Int J Mol Sci.* MDPI, 2021. Vol. 22, № 20.
5. Petersen C., Møller L.B. The RihA, RihB, and RihC ribonucleoside hydrolases of *Escherichia coli*. Substrate specificity, gene expression, and regulation // *Journal of Biological Chemistry.* 2001. Vol. 276, № 2. P. 884–894.
6. 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.
7. Seo B.J. et al. Bile tolerant *Lactobacillus reuteri* isolated from pig feces inhibits enteric bacterial pathogens and porcine rotavirus // *Vet Res Commun.* 2010. Vol. 34, № 4. P. 323–333.
8. Krumbeck J.A. et al. Characterization of the ecological role of genes mediating acid resistance in *Lactobacillus reuteri* during colonization of the gastrointestinal tract // *Environ Microbiol.* 2016. Vol. 18, № 7. P. 2172–2184.
9. Salas-Jara M.J. et al. Biofilm forming *lactobacillus*: New challenges for the development of probiotics // *Microorganisms.* MDPI AG, 2016. Vol. 4, № 3.
10. Hou C. et al. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review // *J Anim Sci Biotechnol.* 2015. Vol. 6, № 1. P. 14.

11. Roos S., Jonsson H. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components // *Microbiology* (N Y). 2002. Vol. 148, № 2. P. 433–442.
12. Gunning A.P. et al. Use of atomic force microscopy to study the multi-modular interaction of bacterial adhesins to mucins // *Int J Mol Sci*. MDPI AG, 2016. Vol. 17, № 11.
13. MacKenzie D.A. et al. Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri* // *Microbiology* (N Y). 2010. Vol. 156, № 11. P. 3368–3378.
14. Wang B. et al. Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells // *Curr Microbiol*. 2008. Vol. 57, № 1. P. 33–38.
15. Jensen H. et al. Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucusbinding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus in vitro // *Microbiology* (United Kingdom). Microbiology Society, 2014. Vol. 160, № PART 4. P. 671–681.
16. Walter J. et al. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract // *Microbiology* (N Y). 2008. Vol. 154, № 1. P. 72–80.
17. Walter J. et al. D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract // *Environ Microbiol*. 2007. Vol. 9, № 7. P. 1750–1760.
18. Frese S.A. et al. Molecular Characterization of Host-Specific Biofilm Formation in a Vertebrate Gut Symbiont // *PLoS Genet*. 2013. Vol. 9, № 12. P. e1004057.
19. Frese S.A. et al. The evolution of host specialization in the vertebrate gut symbiont *Lactobacillus reuteri* // *PLoS Genet*. 2011. Vol. 7, № 2.
20. Su M.S.-W., Gänzle M.G. Novel two-component regulatory systems play a role in biofilm formation of *Lactobacillus reuteri* rodent isolate 100-23 // *Microbiology* (N Y). 2014. Vol. 160, № 4. P. 795–806.
21. Sims I.M. et al. Structure and functions of exopolysaccharide produced by gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23 // *ISME J*. 2011. Vol. 5, № 7. P. 1115–1124.

22. McMillan A. et al. Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011. Vol. 86, № 1. P. 58–64.
23. Olson J.K. et al. Harvesting the benefits of biofilms: A novel probiotic delivery system for the prevention of necrotizing enterocolitis // *J Pediatr Surg*. 2016. Vol. 51, № 6. P. 936–941.
24. Navarro J.B. et al. Enhanced Probiotic Potential of *Lactobacillus reuteri* When Delivered as a Biofilm on Dextranomer Microspheres That Contain Beneficial Cargo // *Front Microbiol*. 2017. Vol. 8.
25. Talarico T.L. et al. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri* // *Antimicrob Agents Chemother*. 1988. Vol. 32, № 12. P. 1854–1858.
26. Mishra S.K. et al. Characterization of a Reuterin-Producing *Lactobacillus reuteri* BPL-36 Strain Isolated from Human Infant Fecal Sample // *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2012. Vol. 4, № 3. P. 154–161.
27. Greifová G. et al. Analysis of antimicrobial and immunomodulatory substances produced by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* // *Folia Microbiol (Praha)*. 2017. Vol. 62, № 6. P. 515–524.
28. Talarico T.L., Dobrogosz W.J. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri* // *Antimicrob Agents Chemother*. 1989. Vol. 33, № 5. P. 674–679.
29. Talarico T.L., Dobrogosz W.J. Purification and Characterization of Glycerol Dehydratase from *Lactobacillus reuteri* // *Appl Environ Microbiol*. 1990. Vol. 56, № 4. P. 1195–1197.
30. Chen G., Chen J. A novel cell modification method used in biotransformation of glycerol to 3-HPA by *Lactobacillus reuteri* // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013. Vol. 97, № 10. P. 4325–4332.
31. Yang G., Tian J., Li J. Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007. Vol. 73, № 5. P. 1017–1024.
32. Stevens M.J. et al. 1,3-Propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production // *Microb Cell Fact*. 2011. Vol. 10, № 1. P. 61.

33. Engels C. et al. Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6, № 1. P. 36246.
34. Cleusix V. et al. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria // *BMC Microbiol*. 2007. Vol. 7, № 1. P. 101.
35. Holz C. et al. Significant Reduction in *Helicobacter pylori* Load in Humans with Non-viable *Lactobacillus reuteri* DSM17648: A Pilot Study // *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2015. Vol. 7, № 2. P. 91–100.
36. Dore M.P. et al. Inclusion of *Lactobacillus Reuteri* in the Treatment of *Helicobacter pylori* in Sardinian Patients // *Medicine*. 2016. Vol. 95, № 15. P. e3411.
37. Dore M.P. et al. *Lactobacillus reuteri* in the treatment of *Helicobacter pylori* infection // *Intern Emerg Med*. 2014. Vol. 9, № 6. P. 649–654.
38. Lionetti E. et al. *Lactobacillus reuteri* therapy to reduce side-effects during anti-*Helicobacter pylori* treatment in children: a randomized placebo controlled trial // *Aliment Pharmacol Ther*. 2006. Vol. 24, № 10. P. 1461–1468.
39. Scaccianoce G. et al. Triple therapies plus different probiotics for *Helicobacter pylori* eradication. // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2008. Vol. 12, № 4. P. 251–256.
40. Francavilla R. et al. Inhibition of *Helicobacter pylori* Infection in Humans by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and Effect on Eradication Therapy: A Pilot Study // *Helicobacter*. 2008. Vol. 13, № 2. P. 127–134.
41. Imase K. et al. *Lactobacillus reuteri* Tablets Suppress *Helicobacter pylori* Infection // *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. 2007. Vol. 81, № 4. P. 387–393.
42. Mehling H., Busjahn A. Non-Viable *Lactobacillus reuteri* DSMZ 17648 (Pylopass™) as a New Approach to *Helicobacter pylori* Control in Humans // *Nutrients*. 2013. Vol. 5, № 8. P. 3062–3073.
43. Francavilla R. et al. *Lactobacillus reuteri* Strain Combination In *Helicobacter pylori* Infection // *J Clin Gastroenterol*. 2014. Vol. 48, № 5. P. 407–413.
44. Abhisingha M., Dumnil J., Pitaksutheepong C. Selection of Potential Probiotic *Lactobacillus* with Inhibitory Activity Against *Salmonella* and Fecal Coliform Bacteria // *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2018. Vol. 10, № 2. P. 218–227.

45. Genís S. et al. A combination of lactic acid bacteria regulates Escherichia coli infection and inflammation of the bovine endometrium // *J Dairy Sci.* 2017. Vol. 100, № 1. P. 479–492.
46. Lesbros-Pantoflickova D., Corthèsy-Theulaz I., Blum A.L. Helicobacter pylori and Probiotics // *J Nutr.* 2007. Vol. 137, № 3. P. 812S-818S.
47. Park S.K. et al. The effect of probiotics on Helicobacter pylori eradication // *Hepatology.* 2007. Vol. 54, № 79. P. 2032–2036.
48. Mukai T. et al. Inhibition of binding of Helicobacter pylori to the glycolipid receptors by probiotic Lactobacillus reuteri // *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002. Vol. 32, № 2. P. 105–110.
49. Ojetti V. et al. Impact of Lactobacillus reuteri Supplementation on Anti-Helicobacter pylori Levofloxacin-Based Second-Line Therapy // *Gastroenterol Res Pract.* 2012. Vol. 2012. P. 1–6.
50. Brenner T.A. et al. Immortalized MH-S cells lack defining features of primary alveolar macrophages and do not support mouse pneumovirus replication // *Immunol Lett.* 2016. Vol. 172. P. 106–112.
51. Piyathilake C.J. et al. Cervical Microbiota Associated with Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected with High-Risk Human Papillomaviruses // *Cancer Prevention Research.* 2016. Vol. 9, № 5. P. 357–366.
52. Karaffová V. et al. Influence of Lactobacillus reuteri L26 Biocenol™ on immune response against porcine circovirus type 2 infection in germ-free mice // *Benef Microbes.* 2017. Vol. 8, № 3. P. 367–378.
53. Ang L.Y.E. et al. Antiviral activity of Lactobacillus reuteri Protectis against Coxsackievirus A and Enterovirus 71 infection in human skeletal muscle and colon cell lines // *Virology.* 2016. Vol. 13, № 1. P. 111.
54. Jørgensen M.R. et al. Probiotic Lactobacillus reuteri has antifungal effects on oral Candida species in vitro // *J Oral Microbiol.* 2017. Vol. 9, № 1. P. 1274582.
55. Thomas C.M. et al. Histamine Derived from Probiotic Lactobacillus reuteri Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 2. P. e31951.
56. Gao C. et al. Histamine H2 Receptor-Mediated Suppression of Intestinal Inflammation by Probiotic Lactobacillus reuteri // *mBio.* 2015. Vol. 6, № 6.

57. Thomas C.M. et al. Folic acid-mediated folate metabolism contributes to suppression of inflammation by probiotic *Lactobacillus reuteri* // *Microbiologyopen*. 2016. Vol. 5, № 5. P. 802–818.
58. Hemarajata P. et al. *Lactobacillus reuteri*-Specific Immunoregulatory Gene *rsiR* Modulates Histamine Production and Immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* // *J Bacteriol*. 2013. Vol. 195, № 24. P. 5567–5576.
59. Linares D.M. et al. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods // *Front Microbiol*. Frontiers Media S.A., 2017. Vol. 8. P. 846.
60. Gu Q. et al. Enhancing vitamin B12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri* // *Int J Food Microbiol*. Elsevier B.V., 2015. Vol. 206. P. 56–59.
61. Morita H. et al. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic Island for reuterin and cobalamin production // *DNA Research*. 2008. Vol. 15, № 3. P. 151–161.
62. Molina V.C. et al. *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 prevents side effects produced by a nutritional vitamin B12 deficiency // *J Appl Microbiol*. 2009. Vol. 106, № 2. P. 467–473.
63. Kšonžeková P. et al. Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: Their influence on adherence of *E. coli* to epithelial cells and inflammatory response // *Carbohydr Polym*. 2016. Vol. 141. P. 10–19.
64. Chen X.Y. et al. Exopolysaccharides synthesized by *Lactobacillus reuteri* protect against enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets // *Appl Environ Microbiol*. American Society for Microbiology, 2014. Vol. 80, № 18. P. 5752–5760.
65. Wang Y., Gänzle M.G., Schwab C. Exopolysaccharide Synthesized by *Lactobacillus reuteri* Decreases the Ability of Enterotoxigenic *Escherichia coli* To Bind to Porcine Erythrocytes // *Appl Environ Microbiol*. 2010. Vol. 76, № 14. P. 4863–4866.
66. Bene K. et al. Gut microbiota species can provoke both inflammatory and tolerogenic immune responses in human dendritic cells mediated by retinoic acid receptor alpha ligation // *Front Immunol*. Frontiers Media S.A., 2017. Vol. 8, № APR.
67. Mu Q., Zhang H., Luo X.M. SLE: Another autoimmune disorder influenced by microbes and diet? // *Front Immunol*. Frontiers Research Foundation, 2015. Vol. 6.

68. Scott K.P. et al. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease // *Microb Ecol Health Dis.* 2015. Vol. 26, № 0.
69. Su Y. et al. Effect of three lactobacilli with strain-specific activities on the growth performance, faecal microbiota and ileum mucosa proteomics of piglets // *J Anim Sci Biotechnol.* 2017. Vol. 8, № 1. P. 52.
70. Garcia Rodenas C.L. et al. Effect of Formula Containing *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 on Fecal Microbiota of Infants Born by Cesarean-Section // *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016. Vol. 63, № 6. P. 681–687.
71. He B. et al. Resetting microbiota by *Lactobacillus reuteri* inhibits T reg deficiency–induced autoimmunity via adenosine A2A receptors // *Journal of Experimental Medicine.* 2017. Vol. 214, № 1. P. 107–123.
72. Britton R.A. et al. Probiotic *L. reuteri* Treatment Prevents Bone Loss in a Menopausal Ovariectomized Mouse Model // *J Cell Physiol.* 2014. Vol. 229, № 11. P. 1822–1830.
73. Wang Z. et al. In Vitro Evaluation of Swine-Derived *Lactobacillus reuteri*: Probiotic Properties and Effects on Intestinal Porcine Epithelial Cells Challenged with Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 // *J Microbiol Biotechnol.* 2016. Vol. 26, № 6. P. 1018–1025.
74. Savino F. et al. Probiotics and gut health in infants: A preliminary case–control observational study about early treatment with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 // *Clinica Chimica Acta.* 2015. Vol. 451. P. 82–87.
75. Martoni C.J. et al. Changes in bile acids, FGF-19 and sterol absorption in response to bile salt hydrolase active *L. reuteri* NCIMB 30242 // *Gut Microbes.* 2015. Vol. 6, № 1. P. 57–65.
76. Jones M.L., Martoni C.J., Prakash S. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial // *Eur J Clin Nutr.* 2012. Vol. 66, № 11. P. 1234–1241.
77. Mobini R. et al. Metabolic effects of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in people with type 2 diabetes: A randomized controlled trial // *Diabetes Obes Metab.* 2017. Vol. 19, № 4. P. 579–589.
78. del Campo R. et al. Improvement of digestive health and reduction in proteobacterial populations in the gut microbiota of cystic fibrosis patients using a *Lactobacillus reuteri*

- probiotic preparation: A double blind prospective study // *Journal of Cystic Fibrosis*. 2014. Vol. 13, № 6. P. 716–722.
79. Zhang D. et al. Changes in the diversity and composition of gut microbiota of weaned piglets after oral administration of *Lactobacillus* or an antibiotic // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016. Vol. 100, № 23. P. 10081–10093.
80. Liu Y. et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 differentially modulates effector memory T cells and Foxp3⁺ regulatory T cells in a mouse model of necrotizing enterocolitis // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2014. Vol. 307, № 2. P. G177–G186.
81. Yang Y. et al. Reutericyclin producing *Lactobacillus reuteri* modulates development of fecal microbiota in weanling pigs // *Front Microbiol*. 2015. Vol. 6.
82. Romani Vestman N. et al. Oral Microbiota Shift after 12-Week Supplementation with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and PTA 5289; A Randomized Control Trial // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 5. P. e0125812.
83. Iniesta M. et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial // *J Clin Periodontol*. 2012. Vol. 39, № 8. P. 736–744.
84. Macklaim J.M. et al. Changes in vaginal microbiota following antimicrobial and probiotic therapy // *Microb Ecol Health Dis*. 2015. Vol. 26, № 0.
85. Petricevic L. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral lactobacilli to improve the vaginal flora of postmenopausal women // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2008. Vol. 141, № 1. P. 54–57.
86. Bisanz J.E. et al. A Systems Biology Approach Investigating the Effect of Probiotics on the Vaginal Microbiome and Host Responses in a Double Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial of Post-Menopausal Women // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, № 8. P. e104511.
87. Gille C. et al. Effect of probiotics on vaginal health in pregnancy. EFFPRO, a randomized controlled trial // *Am J Obstet Gynecol*. 2016. Vol. 215, № 5. P. 608.e1-608.e7.
88. Wang P. et al. Isolation of *Lactobacillus reuteri* from Peyer's patches and their effects on sIgA production and gut microbiota diversity // *Mol Nutr Food Res*. 2016. Vol. 60, № 9. P. 2020–2030.

89. Böttcher M.F. et al. Low breast milk TGF- β 2 is induced by *Lactobacillus reuteri* supplementation and associates with reduced risk of sensitization during infancy // *Pediatric Allergy and Immunology*. 2008. Vol. 19, № 6. P. 497–504.
90. Ericson D. et al. Salivary IgA response to probiotic bacteria and mutans streptococci after the use of chewing gum containing *Lactobacillus reuteri* // *Pathog Dis*. 2013. Vol. 68, № 3. P. 82–87.
91. Braathen G. et al. Presence of *Lactobacillus reuteri* in saliva coincide with higher salivary IgA in young adults after intake of probiotic lozenges // *Benef Microbes*. 2017. Vol. 8, № 1. P. 17–22.
92. Poutahidis T. et al. Microbial Reprogramming Inhibits Western Diet-Associated Obesity // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 7. P. e68596.
93. Poutahidis T. et al. Microbial Symbionts Accelerate Wound Healing via the Neuropeptide Hormone Oxytocin // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 10. P. e78898.
94. Mu Q. et al. Control of lupus nephritis by changes of gut microbiota // *Microbiome*. 2017. Vol. 5, № 1. P. 73.
95. Karimi K. et al. *Lactobacillus reuteri*-induced Regulatory T cells Protect against an Allergic Airway Response in Mice // *Am J Respir Crit Care Med*. 2009. Vol. 179, № 3. P. 186–193.
96. Abediankenari S., Ghasemi M. Generation of immune inhibitory dendritic cells and CD4+T regulatory cells inducing by TGF-beta. // *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2009. Vol. 8, № 1. P. 25–30.
97. Lorea Baroja M. et al. Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients // *Clin Exp Immunol*. 2007. Vol. 149, № 3. P. 470–479.
98. Hsieh F.-C. et al. Heat-killed and live *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 exhibit similar effects on improving metabolic functions in high-fat diet-induced obese rats // *Food Funct*. 2016. Vol. 7, № 5. P. 2374–2388.
99. Lee J. et al. Characterization of the anti-inflammatory *Lactobacillus reuteri* BM36301 and its probiotic benefits on aged mice // *BMC Microbiol*. 2016. Vol. 16, № 1. P. 69.
100. Zelante T. et al. Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22 // *Immunity*. 2013. Vol. 39, № 2. P. 372–385.

101. Cervantes-Barragan L. et al. Lactobacillus reuteri induces gut intraepithelial CD4+CD8 α α + T cells // *Science* (1979). 2017. Vol. 357, № 6353. P. 806–810.
102. Nguyen N.T. et al. The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses // *Int Immunol*. 2013. Vol. 25, № 6. P. 335–343.
103. Yoo B.B., Mazmanian S.K. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut // *Immunity*. 2017. Vol. 46, № 6. P. 910–926.
104. Brun P. et al. Toll-Like Receptor 2 Regulates Intestinal Inflammation by Controlling Integrity of the Enteric Nervous System // *Gastroenterology*. 2013. Vol. 145, № 6. P. 1323–1333.
105. Collins J. et al. Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system // *Neurogastroenterology & Motility*. 2014. Vol. 26, № 1. P. 98–107.
106. Kamiya T. et al. Inhibitory effects of Lactobacillus reuteri on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats // *Gut*. 2006. Vol. 55, № 2. P. 191–196.
107. Pallin A. et al. Evaluation of growth, metabolism and production of potentially bioactive components during fermentation of barley with Lactobacillus reuteri // *Food Microbiol*. 2016. Vol. 57. P. 159–171.
108. Kunze W.A. et al. Lactobacillus reuteri enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening // *J Cell Mol Med*. 2009. Vol. 13, № 8b. P. 2261–2270.
109. Lai N.Y., Mills K., Chiu I.M. Sensory neuron regulation of gastrointestinal inflammation and bacterial host defence // *J Intern Med*. 2017. Vol. 282, № 1. P. 5–23.
110. Mu Q. et al. Leaky Gut As a Danger Signal for Autoimmune Diseases // *Front Immunol*. 2017. Vol. 8.
111. Dicksved J. et al. Lactobacillus reuteri Maintains a Functional Mucosal Barrier during DSS Treatment Despite Mucus Layer Dysfunction // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 9. P. e46399.
112. De Benedetto A. et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011. Vol. 127, № 3. P. 773-786.e7.
113. Rosenfeldt V. et al. Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis // *J Pediatr*. 2004. Vol. 145, № 5. P. 612–616.

114. Camilleri M. et al. Understanding measurements of intestinal permeability in healthy humans with urine lactulose and mannitol excretion // *Neurogastroenterology & Motility*. 2009.
115. Miller R.L., Sabourin C.L.K., Krenitsky T.A. Nucleoside hydrolases from *Trypanosoma cruzi* // *Journal of Biological Chemistry*. 1984. Vol. 259, № 8. P. 5073–5077.
116. Nolan L.L., Kidder G.W. Inhibition of Growth and Purine-Metabolizing Enzymes of Trypanosomid Flagellates by N⁶-Methyladenine // *Antimicrob Agents Chemother*. 1980. Vol. 17, № 4. P. 567–571.
117. Vandemeulebroucke A. et al. Structure and mechanism of the 6-oxopurine nucleosidase from *trypanosoma brucei brucei* // *Biochemistry*. American Chemical Society, 2010. Vol. 49, № 41. P. 8999–9010.
118. Gopaul D.N. et al. Inosine-Uridine Nucleoside Hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Genetic Characterization, Crystallization, and Identification of Histidine 241 as a Catalytic Site Residue †, ‡. 1996.
119. 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.
120. Suthar N., Goyal A., Dubey V.K. Identification of Potential Drug Targets of *Leishmania infantum* by In-silico Genome Analysis // *Lett Drug Des Discov*. 2009. Vol. 6. P. 620–622.
121. Sales E.M. et al. Expression, purification and spectrophotometric analysis of nucleoside hydrolase from *Leishmania chagasi* (LcNH) // *Protein Expr Purif*. Academic Press Inc., 2019. Vol. 161. P. 40–48.
122. 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.
123. Degano M. et al. Trypanosomal Nucleoside Hydrolase. A Novel Mechanism from the Structure with a Transition-State Inhibitor // *Biochemistry*. 1998. Vol. 37. P. 6277–6285.
124. Fish W.R. et al. Purine metabolism in the bloodstream forms of *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense* // *Biochim Biophys Acta*. 1982. Vol. 719. P. 223–231.

125. Meyer N. et al. Three-Dimensional Structure of the Inosine-Uridine Nucleoside N-Ribohydrolase from *Crithidia fasciculata* †, ‡ // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 35. 18259–18262 p.
126. Horenstein B.A. et al. Transition-State Analysis of Nucleoside Hydrolase from *Crithidia fasciculata* // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. P. 10788–10795.
127. Versées W., Barlow J., Steyaert J. Transition-state Complex of the Purine-specific Nucleoside Hydrolase of *T. vivax*: Enzyme Conformational Changes and Implications for Catalysis // *J Mol Biol. Academic Press,* 2006. Vol. 359, № 2. P. 331–346.
128. Versées W. et al. Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax* // *J Mol Biol. Academic Press,* 2001. Vol. 307, № 5. P. 1363–1379.
129. Versées W. et al. Enzyme-substrate interactions in the purine-specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax* // *Journal of Biological Chemistry.* 2002. Vol. 277, № 18. P. 15938–15946.
130. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger principles of biochemistry: International edition.* 8th ed. W.H.Freeman & Co Ltd, 2021.
131. Bzowska A. Purine and pyrimidine nucleoside phosphorylases - remarkable enzymes still not fully understood // *Postepy Biochem.* 2015. Vol. 61, № 3. P. 260–273.
132. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects // *Pharmacol Ther.* 2000. Vol. 88, № 3. P. 349–425.
133. Liang L. et al. The role of a purine-specific nucleoside hydrolase in spore germination of *Bacillus thuringiensis* // *Microbiology (N Y).* 2008. Vol. 154, № 5. P. 1333–1340.
134. Todd S.J. et al. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium // *J Bacteriol.* 2003. Vol. 185, № 11. P. 3373–3378.
135. Guimarães A.P. et al. Analysis of *Bacillus anthracis* nucleoside hydrolase via in silico docking with inhibitors and molecular dynamics simulation // *J Mol Model.* 2011. Vol. 17, № 11. P. 2939–2951.
136. Kopečná M. et al. Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine, and cytokinin ribosides // *Plant Physiol.* 2013. Vol. 163, № 4. P. 1568–1583.

137. Stasolla C. et al. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants // *J. Plant Physiol.* 2003. Vol. 160. P. 1271–1295.
138. Zrenner R. et al. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants // *Annu Rev Plant Biol.* 2006. Vol. 57. P. 805–836.
139. Thicklin L. et al. Purification of a non-specific nucleoside hydrolase from Alaska pea seeds // *Protein Expr Purif. Academic Press Inc.*, 2019. Vol. 154. P. 140–146.
140. Riegler H., Geserick C., Zrenner R. Arabidopsis thaliana nucleosidase mutants provide new insights into nucleoside degradation // *New Phytologist.* 2011. Vol. 191, № 2. P. 349–359.
141. Kurtz J.E. et al. The URH1 uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr Genet.* 2002. Vol. 41, № 3. P. 132–141.
142. Rizzatti A.C.S. et al. Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis* // *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2004. Vol. 31, № 2. P. 88–93.
143. Elshafei A.M., Mohamed L.A., Hassan M.M. Degradation of purine ribonucleosides by extracts of *Penicillium viridicatum* // *Afr J Microbiol Res.* 2011. Vol. 5, № 3. P. 316–323.
144. Elshafei A.M. et al. Mode and extent of degradation of adenosine and guanosine by extracts of *Aspergillus terreus* // *Microbiol Res.* 1995. Vol. 150, № 3. P. 291–295.
145. Abdel-Fatah O.M., Elsayed M.A., Elshafei A.M. Degradation of pyrimidine ribonucleosides by extracts of *Aspergillus terreus* // *African Journal of Biochemistry Research.* 2009. Vol. 3, № 3. P. 52–059.
146. Allam A.M. et al. Nature of the Enzymes that Catalyse the Cleavage of the N-Glycosidic Bond of Pyrimidine Ribonucleosides in Some Filamentous Fungi // *Biochem Syst Ecol.* 1987. Vol. 15, № 5. P. 515–517.
147. Abdel-Fatah O.M., Elsayed M.A., Elshafei A.M. Hydrolytic cleavage of purine ribonucleosides in *Aspergillus phoenicis* // *J Basic Microbiol.* 2003. Vol. 43, № 6. P. 439–448.
148. Versées W.V. et al. Cloning, preliminary characterization and crystallization of nucleoside hydrolases from *Caenorhabditis elegans* and *Campylobacter jejuni* // *Acta Cryst.* 2003. Vol. 59. P. 1087–1089.

149. Singh R.K., Steyaert J., Versées W. Structural and biochemical characterization of the nucleoside hydrolase from *C. elegans* reveals the role of two active site cysteine residues in catalysis // *Protein Science*. Blackwell Publishing Ltd, 2017. Vol. 26, № 5. P. 985–996.
150. Ribeiro J.M.C., Valenzuela J.G. The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti* // *Insect Biochem Mol Biol*. 2003. Vol. 33. P. 13–22.
151. Tarr H.L.A. Fish Muscle Riboside Hydrolases // *J. biol. Chem.* Academic Press, 1955. Vol. 127, № 2. P. 386–391.
152. Belenky P. et al. Nicotinamide Riboside Promotes Sir2 Silencing and Extends Lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 Pathways to NAD⁺ // *Cell*. Elsevier B.V., 2007. Vol. 129, № 3. P. 473–484.
153. Shirai H., Kanatani H. 1-Methyladenosine ribohydrolase in the starfish ovary and its relation to oocyte maturation // *Exp Cell Res*. 1972. Vol. 75, № 1. P. 79–88.
154. Tarr H.L.A. 1-Methyladenosine Hydrolase of Starfish (*Pisaster ochraceus*) // *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 1973. Vol. 30, № 12. P. 1861–1866.
155. Roberts M.F., Wallert G.R. N-methyltransferases and 7-methyl-N⁹-nucleoside hydrolase activity in *Coffea arabica* and the biosynthesis of caffeine // *Phytochemistry*. 1979. Vol. 18, № 3. P. 451–455.
156. Waller G.R., MacVean C.D., Suzuki T. High production of caffeine and related enzyme activities in callus cultures of *Coffea arabica* L. // *Plant Cell Rep*. 1983. Vol. 2, № 3. P. 109–112.
157. Negishi O., Ozawa T., Imagawa H. N-Methyl Nucleosidase from Tea Leaves // *Agric Biol Chem*. 1988. Vol. 52, № 1. P. 169–175.
158. Kanatani H., Shirai H. Chemical Structural Requirements for Induction of Oocyte Maturation and Spawning in Stareishes // *Dev Growth Differ*. 1971. Vol. 13, № 1. P. 53–64.
159. Garau G. et al. Active site plasticity revealed from the structure of the enterobacterial N-ribohydrolase RihA bound to a competitive inhibitor // *BMC Struct Biol*. 2010. Vol. 10. P. 14.
160. West T.P. Degradation of pyrimidine ribonucleosides by *Pseudomonas aeruginosa* // *Antonie Van Leeuwenhoek*. Kluwer Academic Publishers, 1996. Vol. 69. P. 331–335.

161. West T.P. Pyrimidine ribonucleoside catabolic enzyme activities of *Pseudomonas pickettii* // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1994. Vol. 66. P. 307.
162. West T.P. Pyrimidine base and ribonucleoside catabolic enzyme activities of the *Pseudomonas diminuta* group // *FEMS Microbiol Lett*. 1992. Vol. 99, № 2–3. P. 305–310.
163. Porcelli M. et al. Pyrimidine-specific ribonucleoside hydrolase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*- biochemical characterization and homology modeling // *FEBS Journal*. 2008. Vol. 275, № 8. P. 1900–1914.
164. Porcelli M. et al. Thermal Unfolding of Nucleoside Hydrolases from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Role of Disulfide Bonds // *Protein Pept Lett*. 2012. Vol. 19. P. 369–374.
165. Porcelli M. et al. Site-directed mutagenesis gives insights into substrate specificity of *Sulfolobus solfataricus* purine-specific nucleoside hydrolase // *Ann Microbiol*. 2012. Vol. 62, № 2. P. 881–887.
166. Minici C. et al. New determinants in the catalytic mechanism of nucleoside hydrolases from the structures of two isozymes from *Sulfolobus solfataricus* // *Biochemistry*. 2012. Vol. 51, № 22. P. 4590–4599.
167. Terada M., Tatibana M., Hayaishi O. Purification and properties of nucleoside hydrolase from *Pseudomonas fluorescens*. // *Journal of Biological Chemistry*. 1967. Vol. 242, № 23. P. 5578–5585.
168. Ueda A. et al. Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist // *Microb Biotechnol*. 2009. Vol. 2, № 1. P. 62–74.
169. Plancher L. Kinetic mechanism of nucleoside hydrolase from *Escherichia. Coli*: Master of Science thesis. Middle Tennessee State University, 2016.
170. Khoroshkin M.S. et al. Transcriptional regulation of carbohydrate utilization pathways in the *Bifidobacterium* genus // *Front Microbiol. Frontiers Media S.A.*, 2016. Vol. 7, № FEB.
171. Mitsukawa Y. et al. New nucleoside hydrolase with transribosylation activity from *Agromyces* sp. MM-1 and its application for enzymatic synthesis of 2'-O-methylribonucleosides // *J Biosci Bioeng. Elsevier B.V.*, 2018. Vol. 125, № 1. P. 38–45.

172. Mitsukawa Y. et al. A novel nucleoside hydrolase from *Lactobacillus buchneri* LBK78 catalyzing hydrolysis of 2'-O-methylribonucleosides // *Biosci Biotechnol Biochem*. Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry, 2016. Vol. 80, № 8. P. 1568–1576.
173. Kim H.S. et al. Genes encoding ribonucleoside hydrolase 1 and 2 from *Corynebacterium ammoniagenes* // *Microbiology (N Y)*. 2006. Vol. 152, № 4. P. 1169–1177.
174. Johansson P. et al. Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium, *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811T, in association with specific spoilage reactions // *Appl Environ Microbiol*. 2011. Vol. 77, № 13. P. 4344–4351.
175. Hunt C. et al. Kinetic isotope effects of nucleoside hydrolase from *Escherichia coli* // *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2005. Vol. 1751, № 2. P. 140–149.
176. 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.
177. Aučynaite A. et al. Identification of a 2'-O-methyluridine nucleoside hydrolase using the metagenomic libraries // *Molecules*. MDPI AG, 2018. Vol. 23, № 11.
178. Arevalo-Ferro C. et al. Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics // *Environ Microbiol*. 2003. Vol. 5, № 12. P. 1350–1369.
179. Alahmry F.M. In-depth characterization of the purification of adenosine nucleosidase from Alaska pea seeds: Master of Science thesis. Middle Tennessee State University, 2016.
180. Multiple Sequence Alignment [Electronic resource]. URL: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/> (accessed: 10.08.2023).
181. Geneious Prime [Electronic resource]. URL: <http://www.geneious.com/> (accessed: 10.08.2023).
182. Porcelli M. et al. Biochemical characterization and homology modeling of a purine-specific ribonucleoside hydrolase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Insights into mechanisms of protein stabilization // *Arch Biochem Biophys*. 2009. Vol. 483, № 1. P. 55–65.

183. Versées W., Steyaert J. Catalysis by nucleoside hydrolases // *Curr Opin Struct Biol.* Elsevier Ltd, 2003. Vol. 13, № 6. P. 731–738.
184. Iovane E. et al. Structural basis for substrate specificity in group I nucleoside hydrolases // *Biochemistry.* 2008. Vol. 47, № 15. P. 4418–4426.
185. Garrett E.R., Mehta P.J. Solvolysis of Adenine Nucleosides. I. Effects of Sugars and Adenine Substituents on Acid Solvolyses // *J Am Chem Soc.* 1972. Vol. 94, № 24. P. 8532–8541.
186. Giabbai B., Degano M. Crystal structure to 1.7 Å of the Escherichia coli pyrimidine nucleoside hydrolase yeiK, a novel candidate for cancer gene therapy // *Structure.* 2004. Vol. 12, № 5. P. 739–749.
187. Berriman M. et al. The Genome of the African Trypanosome Trypanosoma brucei // *Science (1979).* 2005. Vol. 309. P. 416–422.
188. Parkin A. et al. Amidrazone Analogues of D-Ribofuranose as Transition-State Inhibitors of Nucleoside Hydrolase // *Biochemistry.* 1994. Vol. 33. P. 7089.
189. Evans G., Schramm V., Tyler P. The Immucillins: Design, Synthesis and Application of Transition- State Analogues // *Curr Med Chem.* 2015. Vol. 22, № 34. P. 3897–3909.
190. Nyhan W.L. Disorders of purine and pyrimidine metabolism // *Mol Genet Metab.* 2005. Vol. 86, № 1–2. P. 25–33.
191. Berg M. et al. Evaluation of nucleoside hydrolase inhibitors for treatment of african trypanosomiasis // *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. Vol. 54, № 5. P. 1900–1908.
192. Dantas-Torres F. Leishmune® vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine // *Vet Parasitol.* 2006. Vol. 141, № 1–2. P. 1–8.
193. Huysmans G. et al. Encapsulation of therapeutic nucleoside hydrolase in functionalised nanocapsules // *Journal of Controlled Release.* 2005. Vol. 102, № 1. P. 171–179.
194. Zhao B.-D. et al. Efficient Transformation of Uridine by Escherichia coli Based on Signal Peptide and Molecular Chaperone Strategy // *Biotechnology Bulletin.* 2022. Vol. 38, № 11. P. 238–249.
195. Kim Y.-S. et al. Transgenic tobacco plants producing caffeine: a potential new strategy for insect pest control // *Transgenic Res.* 2006. Vol. 15, № 6. P. 667–672.

196. Jumper J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // Nature. 2021. Vol. 596, № 7873. P. 583–589.
197. Mirdita M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all // Nat Methods. 2022. Vol. 19, № 6. P. 679–682.
198. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
199. Koshkina M.K. et al. Speeding up SDS–PAGE: Theory and experiment // Electrophoresis. 2023. Vol. 44, № 15–16. P. 1155–1164.
200. Chikurova N.Yu. et al. Multicomponent Ugi reaction as a tool for fast and easy preparation of stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography. Part I: The influence of attachment and spacing of the functional ligand obtained via the Ugi reaction // J Chromatogr A. 2022. Vol. 1666. P. 462804.
201. Chikurova N.Yu. et al. A Novel Adsorbent for Hydrophilic Chromatography Based on Silica Modified by the Ugi Reaction // Journal of Analytical Chemistry. 2021. Vol. 76, № 9. P. 1083–1092.
202. Kabsch W. XDS // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010. Vol. 66, № 2. P. 125–132.
203. Evans P. Scaling and assessment of data quality // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2006. Vol. 62, № 1. P. 72–82.
204. Vagin A.A., Isupov M.N. Spherically averaged phased translation function and its application to the search for molecules and fragments in electron-density maps // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2001. Vol. 57, № 10. P. 1451–1456.
205. Winn M.D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2011. Vol. 67, № 4. P. 235–242.
206. Emsley P. et al. Features and development of Coot // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010. Vol. 66, № 4. P. 486–501.
207. Krissinel E., Henrick K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2004. Vol. 60, № 12. P. 2256–2268.
208. Krissinel E., Henrick K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State // J Mol Biol. 2007. Vol. 372, № 3. P. 774–797.

209. Kawachi Y. et al. Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency // *J Chromatogr A*. 2011. Vol. 1218, № 35. P. 5903–5919.
210. Helix Chromatography (USA). HPLC Method for Analysis of Nucleosides and Nucleoside Derivatives on Amaze HD Column [Electronic resource]. URL: <https://helixchrom.com/applications/hplc-method-for-analysis-of-nucleosides-and-nucleoside-derivatives-on-amaze-hd-column/> (accessed: 29.08.2023).
211. Shodex (Japan). Nucleobases and Nucleosides [Electronic resource]. URL: <https://www.shodex.com/en/dc/02/02/01.html> (accessed: 29.08.2023).
212. Pecher D. et al. Determination of thiopurine S -methyltransferase activity by hydrophilic interaction liquid chromatography hyphenated with mass spectrometry // *J Pharm Biomed Anal*. 2017. Vol. 142. P. 244–251.
213. Asano W. et al. Identification of an Arginase II Inhibitor via RapidFire Mass Spectrometry Combined with Hydrophilic Interaction Chromatography // *SLAS Discovery*. 2019. Vol. 24, № 4. P. 457–465.
214. Kohler I. et al. Hydrophilic interaction chromatography – mass spectrometry for metabolomics and proteomics: state-of-the-art and current trends // *Microchemical Journal*. 2022. Vol. 175. P. 106986.
215. van Haren M.J. et al. A Rapid and Efficient Assay for the Characterization of Substrates and Inhibitors of Nicotinamide *N*-Methyltransferase // *Biochemistry*. 2016. Vol. 55, № 37. P. 5307–5315.
216. Traut T.W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines // *Mol Cell Biochem*. 1994. Vol. 140, № 1. P. 1–22.