

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-77

**ПОЛУЧЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НУКЛЕОТИДАЗЫ
ИЗ *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*^{*}**

**OBTAINING AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION
OF NUCLEOTIDASE FROM *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI***

А. Д. Ефремова¹, А. А. Логинова^{1,2}, Н. Н. Мордкович¹,
Н. А. Окорокова¹, А. Н. Антипов¹, В. И. Тишков^{1,2}, А. А. Пометун¹⁻³

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

³Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва

A. D. Efremova¹, A. A. Loginova^{1,2}, N. N. Mordkovich¹,
N. A. Okorokova¹, A. N. Antipov¹, V. I. Tishkov^{1,2}, A. A. Pometun¹⁻³

¹Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” RAS, A. N. Bach Institute of Biochemistry, Moscow

²Lomonosov Moscow State University

³Peoples’ Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow

✉ nasty.efremova.2000@gmail.com

Аннотация

В данной работе проведены клонирование и экспрессия в *Escherichia coli* гена, кодирующего 5'-нуклеотидазу из *Limosilactobacillus reuteri*, получены белковые препараты с сигнальным пептидом и без него с различным расположением последовательности His-tag в растворимой форме. Очистку проводили с помощью металл-хелатной хроматографии. Активность некоторых форм фермента подтверждена с помощью реакции с АМФ.

Abstract

In this work, the gene encoding the 5'-nucleotidase from *Limosilactobacillus reuteri* was cloned and expressed in *Escherichia coli*, and protein preparations with and without the signal peptide were obtained, with a different arrangement of the His-tag sequence in soluble form. Purification was carried out using metal chelate chromatography. The activity of some forms of the enzyme has been confirmed by reaction with AMP.

Устойчивость патогенных бактерий к препаратам антибактериальной терапии неуклонно растет, некоторые из них уже приобрели множественную лекарственную устойчивость, что является серьезной проблемой для общественного здравоохранения. Это определяет необходимость разработки новых антибактериальных препаратов, которые смогут помочь в борьбе с резистентностью к антибиотикам. Данное исследование направлено на изучение функциональной значимости и особенностей доменных пространственных структур некоторых ферментов в пробиотических штаммах лактобактерий для изучения механизма взаимодействия между патогенными штаммами и штаммами — компонентами нормальной микрофлоры, а также потенциальной разработки альтернатив существующим методам лечения бактериальных инфекций. В настоящий момент объектом исследования является фермент 5'-нуклеотидаза, выбор обусловлен его секрецией бактериями *Limosilactobacillus reuteri* при совместном культивировании с патогенным штаммом *Klebsiella pneumoniae* [1].

Ранее было показано, что при проведении сокультивирования бактерий рода *Lactobacillus* и бактерий рода *Klebsiella* два штамма лактобактерий (*Limosilactobacillus reuteri* LR1 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* F) угнетают рост бактерий *Klebsiella pneumoniae*, выделяя в ответ на действие патогена группу белков различных классов и функциональной значимости. Данные белки были идентифицированы с помощью tandemной MALDI/TOF/TOF-спектрометрии. В частности, был выявлен фермент бифункциональная металлофосфатаза, или 5'-нуклеотидаза, из *L. reuteri* (LreBM) [1]. Благодаря тому, что этот вид микроорганизмов является частью нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и влагалища человека, потенциальное применение ферментов из этих бактерий в терапевтических целях, вероятно, не будет провоцировать иммунный ответ. И хотя *L. reuteri* хорошо известна своими пробиотическими свойствами, информация о ее белках в современной научной литературе пока ограничена.

^{*} Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-64-10029).

© А. Д. Ефремова, А. А. Логинова, Н. Н. Мордкович, Н. А. Окорокова, А. Н. Антипов, В. И. Тишков, А. А. Пометун, 2025

В рамках настоящей работы нами было осуществлено моделирование структур для нескольких форм фермента 5'-нуклеотидазы. Получены четыре генетические конструкции, содержащие гены 5'-нуклеотидазы Lre BM с фрагментами, кодирующими шесть остатков гистидина на N- и C-концах, с сигнальными пептидами и без них. Последовательности были подтверждены секвенированием. Экспрессию гена нуклеотидазы проводили в клетках *E. coli*, очистку фермента осуществляли методом металл-хелатной хроматографии, наличие аминокислотная последовательность 5'-нуклеотидазы подтверждены с помощью MALDI/TOF/TOF-спектрометрии. Показано, что полученные препараты нуклеотидазы проявляют активность с АМФ.

Литература

1. Savinova O. S., Glazunova O. A., Moiseenko K. V. et al. Exoproteome Analysis of Antagonistic Interactions between the Probiotic Bacteria *Limosilactobacillus reuteri* LR1 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* F and Multidrug Resistant Strain of *Klebsiella pneumonia* // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, No. 20. P. 10999.