

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА КСАНТОЗИНФОСФОРИЛАЗЫ *ESCHERICHIA COLI*

STUDY ON POTENTIAL ENGINEERING OF *ESCHERICHIA COLI* XANTHOSE PHOSPHORYLASE STRAIN-PRODUCER

A. В. Дайнеко¹, А. Б. Булатовский², А. И. Зинченко^{1,2}

A. Daineko¹, A. Bulatovski², A. Zinchenko^{1,2}

¹*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь*

²*Институт Микробиологии НАН Беларусь,
г. Минск, Республика Беларусь
dainecko@list.ru*

¹*Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

²*Institute of Microbiology NAS Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

Генная инженерия является активно развивающейся отраслью современной биотехнологии. С использованием методов генной инженерии можно конструировать новые формы микроорганизмов, способных синтезировать самые различные вещества, в том числе и ферменты. Ксантозинфосфорилаза, также известная как вторая пуриновая нуклеозидфосфорилаза в *E. coli*, осуществляет как реакцию фосфоролиза, так и синтеза пуриновых дезокси / рибонуклеозидов. Благодаря такой способности ксантозинфосфорилаза может катализировать реакцию образования никотинамидрибозида. Данное соединение является предшественником важнейшего в организме кофермента НАД⁺, выполняющего ключевую роль в процессе старения.

В результате проведенного исследования сконструирован новый штамм *E. coli* pET42a-xapA, производящий белок ксантозинфосфорилазу.

Genetic engineering is an actively developing branch of modern biotechnology. Using the methods of genetic engineering, it is possible to construct new forms of microorganisms that can synthesize a variety of substances, including enzymes. Xanthosine phosphorylase is the second purine nucleoside phosphorylase (PNP-II) in *E. coli*. This enzyme performs both reactions of phosphorolysis and the synthesis of purine deoxy / ribonucleosides. Due to this ability, xanthosine phosphorylase can catalyze the reaction of the formation of nicotinamide riboside. This substance is a precursor of the most important coenzyme NAD⁺ in the body, which plays a key role in the aging process.

As a result of the study, a new strain of *E. coli* pET42a-xapA was constructed. This strain produces the protein xanthosine phosphorylase.

Ключевые слова: никотинамидрибозид, ксантозинфосфорилаза, инозин, *Escherichia coli*.

Keywords: nicotinamide riboside, xanthosine phosphorylase, inosine, *Escherichia coli*.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-38-41>

В настоящее время значительно расширилась область изучения процессов старения. Исследования кофермента НАД⁺ предоставили возможность изучить патогенез данного процесса в организме. Снижение уровня содержания данного химического соединения в организме стало главной причиной возрастного функционального спада и болезней старческого возраста [1].

Существует несколько путей синтеза кофермента НАД⁺, но одним из важнейших является «селвидж»-путь, в ходе которого он продуцируется из предшественников: никотинамида, никотинамидрибозида и никотинамид-мононуклеотида. Повысив уровень прекурсоров, можно значительно восполнить уровень НАД⁺, утраченного в процессе старения организма [2]. Исследования зарубежных авторов показали, что никотинамидрибозид является наиболее альтернативным предшественником данного кофактора.

Современный уровень знаний биохимии, молекулярной биологии и генетики позволяет рассчитывать на успешное развитие новой биотехнологии – генной инженерии. Данная область современной биотехнологии добилась самых впечатляющих результатов в современном мире. Одним из способов получения никотинамидрибозида является использование рекомбинантного фермента ксантозинфосфорилазы, также известного как пуриннуклеозидфосфорилаза-II (ПНФ-II). С помощью генетических и биохимических исследований зарубежных авторов было обнаружено, что ксантозинфосфорилаза в клетках *E. coli* катализирует реакцию получения никотинамидрибозида из никотинамида. Данный фермент использует никотинамид гораздо менее эффективно, что указывает на то, что никотинамид является нетипичным субстратом. Поэтому возможность конвертировать

никотинамид в никотинамидрибозид оказывается «побочным эффектом» для ксантозинфосфорилазы. Однако такой побочный эффект является достаточным для поддержания выживаемости *E. coli* [3].

ПНФ-II катализирует обратимую фосфоролитическую реакцию, при которой расщепляются пуриновые рибо/дезоксирибонуклеозиды с образованием свободного основания и рибозо-1-фосфат [4].

Исходя из вышеизложенного возможно осуществление реакции получения никотинамидрибозида, используя фермент ксантозинфосфорилазу в два этапа:

1. Получение рибозо-1-фосфата, используя пуриновый нуклеозид.

2. Получение никотинамидрибозида из никотинамида.

На первом этапе происходит фосфоролиз пуринового нуклеозида. В качестве субстрата используется инозин либо ксантозин, поскольку активность фермента ксантозинфосфорилазы наиболее оптимальна в присутствии данных субстратов. В качестве донора фосфатной группы используется неорганический фосфат. На втором этапе идет реакция синтеза пуринового нуклеозида [4].

В связи с изложенным выше, целью работы явилось: создание штамма-продуцента гомологичной рекомбинантной ксантозинфосфорилазы.

Источником гена *xapA*, кодирующего последовательность аминокислот в ксантозинфосфорилазе *E. coli*, служила геномная ДНК штамма бактерии *E. coli* K-12. Клетки культивировали в присутствии ксантозина. Экспрессия гена строго зависит от присутствия данного соединения в качестве индуктора [4].

Геномную ДНК из биомассы клеток *E. coli* K-12 выделяли с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США). Клонирование гена *xapA* производили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением специально подобранных праймеров (таблица 1).

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров

Праймер	Назначение
<i>xapA_F</i> (5'-GTGGTGGTCCACAAACATGTCTCAGGTTCAATTCTCA-3')	Прямой праймер для амплификации гена <i>xapA</i>
<i>xapA_R</i> (5'-GGTGATGGTGATGCTCTCAGGCAATTGCGCAG-3')	Обратный праймер для амплификации гена <i>xapA</i>
pET 42 lntF (5'-CATATGTATATCTCCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAG-3')	Прямой праймер для амплификации плазиды pET-42a (+)
42 lnt R (5'-GTTGTGGACCACCATATGTATATCTCCTTCTT-3')	Обратный праймер для амплификации плазиды pET-42a (+)

На следующем этапе мы создавали генетическую конструкцию, состоящую из плазиды и встроенного в нее целевого гена. В данной работе была использована плазмиды pET-42a (+), т.к. система pET является наиболее мощной и разработана для клонирования и экспрессии рекомбинантных белков в *E. coli*. Данная плазмиды была амплифицирована и линеаризована методом ПЦР с применением специально подобранных праймеров (таблица 1). Встраивание гена в плазмиду проводили методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) [5]. Данный метод основан на удлинении перекрывающейся области между вставкой и векторным фрагментом с образованием протяженной конкатамерной генетической конструкции. Таким образом была получена генетическая конструкция, обозначенная нами pET42a-xapA.

Полученной ПЦР-смесью трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* BL21(DE3). В данном штамме полностью отсутствует «фоновая» экспрессия, поскольку транскрипция и сопряженная с ней трансляция клонированного гена возможны только после индуцированного синтеза фаговой РНК-полимеразы. Клонирование гена в плазмиду pET обеспечит гарантированное попадание вставки ДНК в нужную рамку чтения.

Трансформированные бактерии высевались на плотную LB-среду с селективным антибиотиком (канамицином) и растались в течении 24 ч, по прошествии этого времени, выросшие колонии анализировались по признакам на цвет, прозрачность, текстуру края колоний. По совокупности правильных признаков (колонии прозрачные, с ровным краем, светло-бежевого цвета) был сделан вывод, что трансформация бактерий прошла успешно. ДНК клонов подвергли ПЦР-скринингу для подтверждения наличия гена *xapA*.

Клетки-трансформанты культивировали в жидкой питательной среде LB при 37°C на термостатированном биологическом шейкере. По достижению оптической плотности 0,6 при $\lambda=600$ нм добавляли в среду 0,5 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,2 мМ, для индукции синтеза ксантозинфосфорилазы. Далее продолжили процесс культивирования клеток 3 ч. Причем каждый час отбиралась аликвота (1 мл) для оценки наработки белка. По окончанию культивирования клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 8,0).

Отобранные аликвоты подвергали ультразвуковой дезинтеграции с помощью прибора Sonifier-450 (Branson, США) при следующих режимах: мощность – 0,05 кВт; температура – 4 °C; продолжительность – 1 мин.

На следующем этапе исследования проводили электрофорез белка в полиакриламидном геле (рис. 1). Известно, что размер белка ксантозинфосфорилазы 31,3 кДа. Исходя из размера, нами был выбран 12% разделяющий гель. В лунки концентрирующего геля были внесены 6 образцов и маркер. Для окрашивания геля использовали краситель кумасси бриллиантовый голубой R250.

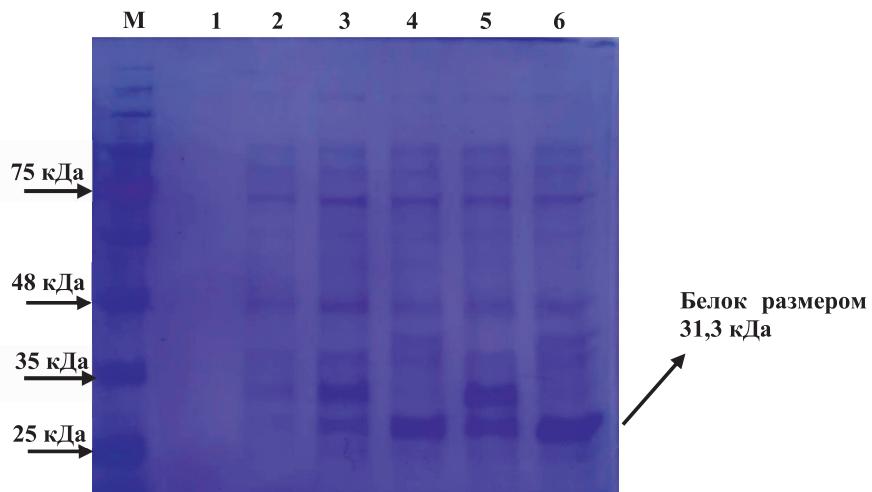


Рис. 1 – Электрофорограмма в DCH-полиакриламидном геле ксантозинфосфорилазы до индукции (1) и после индукции белка (2–6)

Из электрофорограммы видно, что в образцах находится исследуемый белок, который соответствует размеру 31,3 кДа. Также можно отметить то, что максимальное накопление белка наблюдается спустя 3 ч после начала индукции.

На следующем этапе работы определяли активность белка в реакционной смеси, содержащей 1 мМ инозин, 40 мМ КФБ (рН 7,0) и 0,05% ксантозинфосфорилазы (добавляли последней). В данной реакции происходит фосфоролиз инозина под действием ксантозинфосфорилазы (рис. 2).

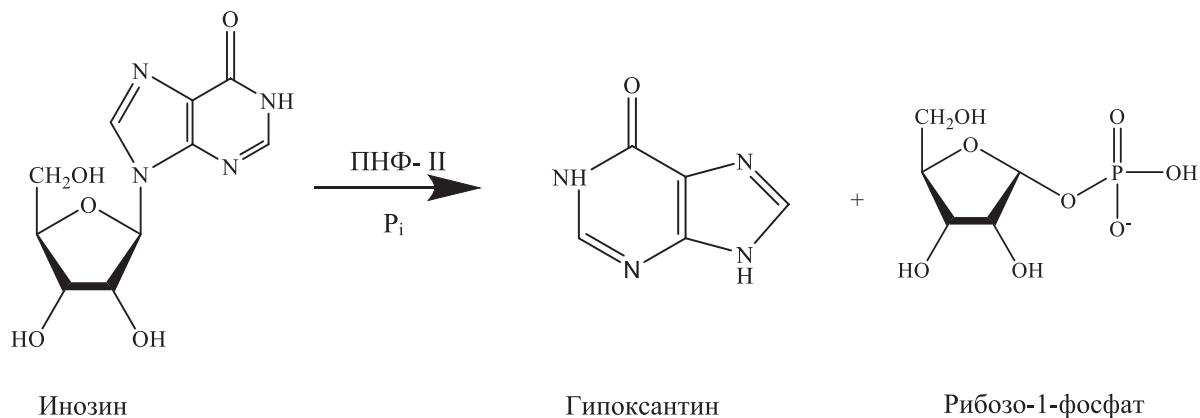
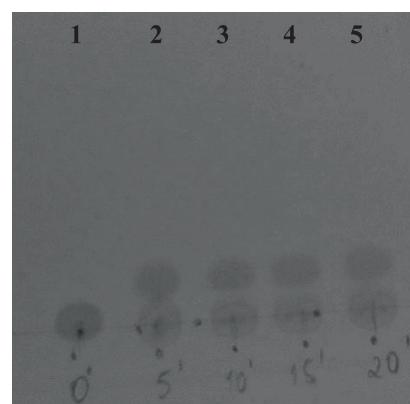


Рис. 2 – Схема разложения инозина под действием ксантозинфосфорилазы

Реакция была проведена на водяной бане с постоянным помешиванием и определенной температурой 37°C, которая является оптимальной для работы исследуемого фермента. Через каждые 5 мин анализируемый раствор наносили на стартовую линию хроматографической пластиинки с помощью стеклянного капилляра в объеме 3 мкл. В качестве элюента использовали смесь растворителей: 10 мл хлороформа, 10 мл изопропанола и 1 мл аммиака. Хроматограмму визуализировали при ультрафиолетовом свете (рис. 3).



*Рис. 3 – Визуализация хромотограммы под ультрафиолетовым светом:
1 – образец перед внесением фермента; 2 – на 5-й мин, 3 – на 10-й мин; 4 – на 15-й мин; 5 – на 20-й мин.*

Из хромотограммы видно, что в образце под номером 1 не наблюдается протекания реакции, так как проба была взята до внесения фермента. Но в образцах 2–5 визуализируется продукт реакции, предположительно гипоксантин, так как рибозо-1-фосфат не поглощает ультрафиолетовый свет. Таким образом, можно судить о том, что ксантозинфосфорилаза проявляет каталитические свойства в реакции фосфоролиза инозина.

В результате выполненного исследования был сконструирован штамм *E. coli* pET42a-харА, продуцирующий рекомбинантную ксантозинфосфорилазу. Также была доказана активность данного фермента в отношении инозина. В дальнейшей работе планируется очистить белок и количественно определить его продуцирующую способность.

ЛИТЕРАТУРА

1. NAD⁺ in Aging: Molecular Mechanisms and Translational Implications / E. F. Fang [et al.] // Trends in Molecular Medicine. 2017;23:10:899–916.
2. Yoshino J. NAD⁺ Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR / Yoshino J, Joseph BA, Imai S // Cell Metabolism. 2018;27:3:513–528.
3. New function for *Escherichia coli* xanthosine phosphorylase (xapA): genetic and biochemical evidences on its participation in NAD⁺ salvage from nicotinamide / Dong W [et al.] // BMC Microbiology. 2014;14:29:1471–2180.
4. Hammer-Jespersen K. A second purine nucleoside phosphorylase in *Escherichia coli* K-12. II. Properties of xanthosine phosphorylase and its induction by xanthosine / Hammer-Jespersen K, Buxton RS, Hansen TD // Molecular and General Genetics. 1980;179:2:341–348.
5. Could nested PCR be applicable for the study of microbial diversity / Quan ZX [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009;25:8:1447–1452.

СИНТЕЗ ТРИГИДРОКСИ-ИНОЗИНА

SYNTHESIS OF TRIHYDROXY-INOSINE

Е. С Деусова, М. А. Ханчевский, Е. И. Квасюк
E. S. Deusova, M. A. Khancheuski, E. I. Kvasyuk

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
liza20010226@gmail.com
Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus

Нуклеозиды, имеющие в своём составе остатки «разорванного» углеводного фрагмента в виде диальдегида или триола обладают необычным строением и называются секо-нуклеозидами. Они обладают широким спектром биологической активности, которая до настоящего времени изучена недостаточно. Это связано с высокой реакционной способностью альдегидных и гидроксильных групп, приводящей к неоднозначности структуры соединений. В работе представлены два подхода к синтезу тригидрокси-инозина из инозина. Показано, что метод окисления диольной группировки нуклеозидов с помощью ионообменной смолы в IO₄⁻-форме имеет преимущества перед традиционным методом, использующим NaIO₄.

Nucleoside derivatives with broken sugar moiety like dialdehydes or trioles have unusual structures and are called seco-nucleosides. They have different types of biological activity which till this time have not been studied enough. It is a result of the high reactivity of aldehyde and hydroxyl groups and the unusual structure of compounds. This article presents two approaches for the synthesis of trihydroxy-inosine from inosine. It was shown that the method for oxidation of diol groups of ribonucleosides using the ion exchange resin in IO₄⁻-former has preferences to the method which used NaIO₄ as a reagent.

Ключевые слова: инозин, инозин-диальдегид, тригидрокси-инозин, синтез, биологическая активность.

Keywords: inosine, inosine-dialdehyde, trihydroxy-inosine, synthesis, biological activity.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-41-44>

Создание новых эффективных лекарственных препаратов является одним из приоритетных направлений в современной фармацевтической индустрии. Разработка инновационного лекарственного препарата всегда начинается с поиска нового биологически активного соединения с последующим подтверждением его эффективности и безопасности.