

Goncharevskiy S., PhD stud., Makarchyk M., DSc, V. Martynyuk, DSc  
ESC "Institute of biology and medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

### TEMPERATURE OF REPRESENTATIVE AREAS OF THE BREAST DEPARTMENT OF THE VEGETATIVE NERVOUS SYSTEM, AS THE INDEX OF THE FUNCTIONAL STATE OF THE HUMAN BIRTH ORGANISM

Almost all processes in the human body in one way or another connected with the autonomic nervous system. That's why it is real to evaluate the functional state of the person by temperature characteristics of representative points of the autonomic nervous system. Location and information of these points are confirmed by fundamental research. However, simply measuring the temperature at some points may not be sufficient to establish any systematic changes in the human body. The establishment of such changes requires systematic assessment of interdependent significant relationships between these parameters. The main aim of our research was to study effects of myocardial infarction in the thoracic region of the autonomic nervous system. The temperature of representative areas of the thoracic autonomic nervous system we measured by infrared thermometer (Medisana FTO D-53340, with an accuracy of 0.1 degree Celsius). Statistical analysis was conducted in the packet Statistics 10. The presence of a difference in the temperature coefficients of representative areas ( $p < 0,05$ ). For the left side of the spine characterized by a difference in Th1–Th5 segments, which confirms their diagnosis: Th1 –  $0,93 \pm 1,12$  (control) and  $-0,79 \pm 7,49$  (experiment), Th2 –  $1,57 \pm 1,12$  and  $-0,48 \pm 6,70$ , Th3 –  $1,58261 \pm 1,12325$  and  $-0,66 \pm 3,36$ , Th4 –  $0,85913 \pm 0,92611$  and  $-1,7 \pm 4,64$ , Th5 –  $0,92348 \pm 0,75469$  and  $-1,61 \pm 5,73$  respectively.

For the right side of the thoracic spines: Th6 –  $0,85 \pm 0,73$  (control) and  $-0,79 \pm 7,49$  (experiment), Th7 –  $-1,00 \pm 0,79$  and  $-1,37 \pm 0,69$ , Th8 –  $-0,96 \pm 0,73$  and  $-0,99 \pm 0,68$ , Th9 –  $-0,12 \pm 0,64$  and  $-0,38 \pm 0,83$ , Th10 –  $-0,92 \pm 1,14$  and  $-1,03 \pm 1,00$ , Th11 –  $-1,69 \pm 1,05$  and  $-1,86 \pm 1,06$ , Th12 –  $-1,65 \pm 1,15$  and  $-1,96 \pm 1,12$  respectively. We found that myocardial infarction is manifested in the thoracic spine. In an experimental group there is significant difference of temperature in all segments. We can also notice asymmetry of temperature between the right and left side of the spine. In the test group there are a deviation from the normal temperature in the first five thoracic segments on the left side, which confirms their diagnosis. On the right side of the spine there are a deviation in the last seven segments, which may indicate the compensatory mechanisms of regulation of the system. We can observe the temperature asymmetry, which in long-term exposure can negatively affect to the body.

Key words: autonomic nervous system, representative areas, temperature, heart attack.

УДК 577.217.5

В. Засць, канд. біол. наук, О. Цуварєв, асп.,  
О. Корнелюк, чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,  
Л. Коломієць, в. о. наук. співроб.  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

### БАКТЕРІАЛЬНА ЕКСПРЕСІЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ФУНКЦІОНАЛЬНО АКТИВНОГО N-КІНЦЕВОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ *B. TAURUS*

Проведено клонування в експресуючий вектор pET23d(+) кДНК, кодуєної N-кінцевої каталітичної модуль тирозил-тРНК синтетази (міні TyrRS) *Bos taurus*. Експресовано у клітинах *E. coli* BL21(DE3)pLysE та виділено високоочищений рекомбінантний білок міні TyrRS із використанням сконструйованого експресуючого вектора pET-23d(+)39YRS для фізико-хімічних досліджень. Досліджено каталітичну активність рекомбінантної міні TyrRS у реакції аміноацилювання гомологічної тРНК.

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза, міні TyrRS, клонування, бактеріальна експресія.

**Вступ.** Розробка та впровадження у клінічну практику нових біомедичних препаратів на основі рекомбінантних білків є пріоритетним напрямом сучасної біотехнології [1]. Нині для отримання рекомбінантних білків існує декілька гетерологічних експресійних систем, заснованих на використанні клітинних ліній ссавців, клітин дріжджів і бактерій, а також бакуловірусних систем на основі клітинних ліній комах [2]. Серед них найуживанішою є бактеріальна система *E. coli*. Експресія білків в *E. coli* є простим, швидким і недорогим методом, який дозволяє отримати рекомбінантні білки у препаративних кількостях у нативному стані, що є необхідною умовою для їх упровадження в біотехнологічне виробництво [3–5].

Одним із перспективних об'єктів для використання як лікарських препаратів є тирозил-тРНК синтетаза ссавців. Аміноацил-тРНК синтетаза (TyrRS) є ключовим ферментом білоксинтезуючого апарату клітини. На дорібосомному етапі трансляції у високоспецифічній енергозалежній реакції синтетаза каталізує активацію спорідненої амінокислоти та приєднання її до гомологічної транспортної РНК, здійснюючи таким чином першу стадію декодування інформації про структуру білка, закладену в нуклеотидній послідовності ДНК та РНК [6].

Тирозил-тРНК синтетаза *Bos taurus* (528 амінокислотних залишків (а. з.), 59,2 кДа) складається із двох структурних одиниць, N-кінцевого каталітичного (відповідає вкороченій формі ферменту міні TyrRS, 342 а. з., 39 кДа) та С-кінцевого цитокіноподібного (166 а. з., 20 кДа) модулів. У повнорозмірній TyrRS N-кінцевому модулю, який містить у своїй структурі згортку Россма-

на, притаманна повна каталітична функція зв'язування амінокислоти із тРНК, тоді як С-модуль коригує та стабілізує розміщення тРНК в активному центрі ферменту [7]. Після розщеплення тирозил-тРНК синтетази еластазою на міні TyrRS та С-модуль, останній проявляє цитокінові властивості, стимулюючи активність тканинного фактора некрозу пухлини TNF $\alpha$  та міграцію поліморфноядерних нейтрофілів [8, 9].

У фізіологічних умовах тирозил-тРНК синтетаза *Bos taurus* являє собою гомодимер  $\alpha_2$ -типу з молекулярною вагою  $2 \times 59,2$  кДа, мономером якого є повнорозмірний фермент. При виділенні TyrRS із печінки бика було показано, що поряд з основною формою виділяється також і функціонально активна протеолітично модифікована форма тирозил-тРНК синтетази з молекулярною вагою 39 кДа, яка має повну ферментативну активність в експериментах *in vitro*.

Тести на цитокінову активність NH<sub>2</sub>-кінцевого каталітичного домену TyrRS неочікувано виявили, що міні TyrRS і сама є цитокіном [9–11]. Вона є хемотаксичним фактором для нейтрофілів, а також стимулює ангіогенез по концентраційно залежному шляху. Вважається, що цитокінова активність міні TyrRS опосередковується консервативним мотивом ELR у каталітичному домені у згортці Россмана, який є критичним в активації нейтрофілів для СХС-хемокінів.

Оскільки N-кінцевий каталітичний модуль синтетази являє собою інтерлейкін-подібний цитокін і проявляє проангіогенні властивості, цей білок є досить перспек-

тивним біотехнологічним продуктом. Водночас цитокінові властивості міні TyrRS практично не вивчені.

Метою нашої роботи було створення експресуючої плазмідної конструкції для напрацювання в *E. coli* каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* для вивчення каталітичних та цитокінових властивостей ферменту.

**Матеріали і методи.** Для відбору рекомбінантних клонів та експресії кДНК каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* використовували відповідно генно-інженерні штами *E. coli* DH5α та BL21(DE3)pLysE. Компетентні клітини *E. coli* отримували згідно з методом Нішімури і співавторів [12]. Усі процедури із клонування фрагменту повнорозмірної кДНК тирозин-тРНК синтетази, що кодує послідовність міні TyrRS, у плазмідному векторі – рестрикцію, лігування, полімеразну реакцію, трансформацію та виділення плазмідної ДНК, – проводили за допомогою ендонуклеаз рестрикції, полімерази фага T4 та лігази фірм "New England Biolabs" (США) та "ThermoScientific" (Литва) згідно з методиками [13] та інструкціями фірм. Плазмідні конструкції аналізували методом електрофорезу в 0,7–1%-му агарозному гелі. Для виділення необхідних фрагментів ДНК із гелю застосовували набір реагентів AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit фірми "Axygen Biosciences" (Німеччина). Для клонування використовували плазмідні вектори pBBYRS8 та pET23d(+) фірми "Novagen" (США).

Вирощування культури *E. coli* та індукцію експресії рекомбінантної міні ТирРС у бактеріальній культурі проводили в середовищі Лурія-Бертрані (LB) із 30 мкг/мл канаміцину. Трансформовані рекомбінантною плазмідною pET23d-39KYRS компетентні клітини *E. coli* BL21(DE3)pLysE вирощували на шейкері (Environmental Shaker Incubator ES-20) при 37 °С до оптичної густини  $A_{600}=0,7$  та індукували синтез цільового білка додаванням 1М ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозидом (IPTG) до 1 мМ концентрації з наступною інкубацією при 20 °С упродовж 18 годин. Зібрану біомасу зі 100 мл культури ресуспендували у 12 мл буфера для лізису клітин (50 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 10 мМ імідазол, 5 мМ β-меркаптоетанол). Лізис проводили за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗ-озвучуванням (6 циклів по 20 с, інтервали 20 с). Лізат освітлювали центрифугуванням при 13000 об/хв упродовж 30 хв при 4 °С. Супернатант наносили на врівноважену буфером для лізису клітин Ni-NTA агарозну колонку об'ємом 1 мл, промивали 10 мл буфера для промивки (50 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 20 мМ імідазол, 5 мМ β-меркаптоетанол). Рекомбінантний білок елюювали 5 мл буфера для елюції (50 мМ натрій-фосфатного буфера, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 200 мМ імідазол, 5 мМ β-меркаптоетанол). Після електрофоретичного аналізу елюату в 12%-му поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах у буферній системі Леммлі [14] фракції, у яких було виявлено білок, об'єднували і діалізували проти 200 мл буфера для діалізу (500 мМ натрій-фосфатний буфер рН 8,0, 150 мМ NaCl) упродовж 20 годин при +4 °С. Реакцію аміноацилювання проводили в об'ємі 20–50 мкл у буфері 30 мМ HEPES-KOH, рН 7,6, 20 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ ATP, рН 7,0, 2 мМ DTT, 10–20 мкМ [<sup>14</sup>C]тирозин (питома активність 1332 ПБк/моль), 0,1–1 мкМ тРНК дріжджів. Останнім у реакційну суміш вносили препарат міні TyrRS до кінцевої концентрації 0,1–0,5 мкМ і проводили інкубацію при 25 °С. Реакцію зупиняли додаванням 10 об'ємів охолодженого 7%-го розчину ТХУ, фільтрували через скловолокнисті фільтри GF-C та вимірювали

радіоактивність у толуольному сцинтиляторі на приладі "RACK-BETA" [15].

**Результати та їх обговорення.** У відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ була отримана, клонована та секвенована повна нуклеотидна послідовність кДНК гена тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* [16], а також створена експресуюча конструкція pET-30a(+)-39KYRS, що містила вставку, яка кодує каталітичний N-кінцевий модуль TyrRS (M1–P342). Вставка містила також послідовність нуклеотидів, яка кодує міжмодульний лінкер (D343–E359) і 17 а. з. С-модуля (P360–377) згідно з неопублікованими даними Дубровського О. Л.

Експресований даною плазмідною рекомбінантний білок у штамі *E. coli* BL21 (DE3) зберігав аміноацилюючу здатність, притаманну для нативної міні TyrRS, однак мав у своїй N-кінцевій частині послідовність із 43 амінокислот вектора, включаючи 6×His-Tag. Така локалізація амінокислотної послідовності вектора є близькою до активного центра ферменту, що могло впливати на його конформацію та біологічну активність.

У зв'язку з цим вирішено створити нову плазмідну конструкцію із клонованою послідовністю міні TyrRS на основі експресуючого вектора, який би містив 6×His-Tag послідовність на С-кінці білка, що значно далі від активного центра ферменту. Для клонування послідовності міні TyrRS вибрано бактеріальний експресуючий вектор pET23d(+). Даний вектор також має сильний промотор РНК полімерази фага T7 [17], як і у pET30a, але, на відміну від останнього, полігистидиновий таг для афінної хроматографії рекомбінантних білків у pET23d(+) розміщений на 3'-кінці поліклонального сайту безпосередньо перед stop-кодоном. Таким чином, експресовані в pET23d(+) рекомбінантні білки мають 6×His-Tag послідовність на своєму С-кінці. Для попередження включення в рекомбінантний білок міні TyrRS амінокислот, що кодується поліклональним сайтом вектора, було вирішено клонувати фрагмент послідовності кДНК, що кодує синтетазу, у pET23d(+) за сайтами NcoI – XhoI.

Як донор нуклеотидної послідовності каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази нами взято рекомбінантну плазмиду pBBYRS8, яка кодує повнорозмірну тирозил-тРНК синтетазу *Bos taurus*, клоновану в неекспресуючому векторі pSK8(+) по рестриктивним сайтам EcoRI – XbaI.

Аналіз клонованої послідовності кДНК тирозил-тРНК синтетази у плазміді pBBYRS8 показав, що кодуєча послідовність N-кінцевого каталітичного модуля ферменту, за винятком послідовності останніх 20 амінокислот з COOH-кінця білка, міститься між сайтами рестрикції NcoI та BamHI. Рестриктивний сайт NcoI є унікальним у pBBYRS8. Але конструкція має в послідовності клонованої кДНК синтетази два сайти рестрикції ендонуклеазою BamHI. Тому у процесі експериментальної роботи із клонування нами спочатку видалено із pBBYRS8 не суттєвий для послідовності міні TyrRS фрагмент BamHI–BamHI, а потім виділено фрагмент NcoI–BamHI, що кодує каталітичний модуль синтетази, для подальшого клонування в pET23d(+). Оскільки липкий кінець рестриктного сайту ендонуклеази BamHI фрагмента відрізняється від липкого кінця сайту XhoI вектора, для збігання рамки зчитування кодуєчої послідовності міні TyrRS із гістидиновим тагом вектора, виступаючі кінці цих рестриктних сайтів фрагмента та вектора були затуплені у процесі клонування полімеразою фага T4. Таким чином, кодуєча послідовність N-кінцевого каталітичного модуля ферменту була клонована у векторі pET23d(+) по рестриктному сайту NcoI та тупих кінцях сайтів BamHI та

XhoI. У результаті була отримана конструкція pET-23d(+)-39YRS, де у векторі pET23d(+) був клонований фрагмент кДНК, що кодує міні TyrRS, починаючи з метіонінового кодону ATG у 1 положенні і закінчуючи кодоном аспарагінової кислоти GAT у 322 положенні нуклеотидної послідовності ферменту.

При експресії N-кінцевого каталітичного модуля синтети у створеній конструкції pET-23d(+)-39KYRS у NH<sub>2</sub>-кінець рекомбінантного білка не вноситься жодна амінокислота, яка б кодувалась нуклеотидною послідовністю вектора. Синтез починається безпосередньо з кодону ATG, що кодує першу амінокислоту ферменту. Із COOH-кінця до білка приєднані лише 8 додаткових амі-

нокислотних залишків, які кодуються вектором, включаючи послідовність із 6 гістидинів. Отже, мінімізується вплив вектора на властивості рекомбінантного білка, оскільки в його структуру вноситься лише кілька додаткових амінокислотних залишків, а послідовність 6×His tag міститься значно далі від каталітичного центра порівняно з конструкцією pET30a-39KYRS. Делеція останніх 20 амінокислотних залишків із COOH-кінця клонованої міні TyrRS не може впливати на її каталітичні властивості, оскільки ці залишки не входять до каталітичного домену ферменту. Структурна організація клонованого N-кінцевого каталітичного модуля TyrRS показана на рис. 1.

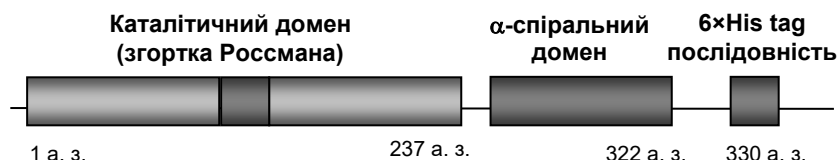


Рис. 1. Доменна організація каталітичного модуля тирозил-тРНК синтети у плазмідній конструкції pET-23d(+)-39KYRS

Тест на експресію клонованої послідовності міні TyrRS отриманою плазмідною конструкцією pET-23d(+)-39KYRS у бактеріальній культурі штаму *E. coli* BL21(DE3)pLysE показав ефективний синтез рекомбінантного білка, що збігається за молекулярною вагою з N-кінцевим каталітичним доменом тирозил-тРНК синтети. В аналітичних експериментах встановлено, що плазміда забезпечує синтез у середовищі Лурія-

Бертрані до 10–12 мг/л рекомбінантної міні TyrRS, чистота якої після виділення на Ni-NTA агарозі досягає 95 % (рис. 2). Максимальна експресія білка спостерігалася при концентрації індуктора синтезу білка ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозиду (IPTG) 1 мМ у культуральному середовищі й культивуванні *E. coli* при температурі 20 °C після додавання індуктора.

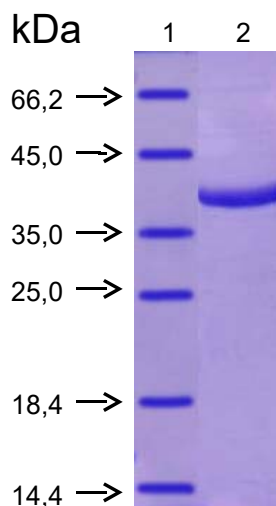


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз молекулярної ваги та чистоти виділеного на Ni-NTA агарозі рекомбінантного білка міні TyrRS у 12%-му поліакриламідному гелі в буферній системі Леммлі:

1 – білковий маркер( Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431 ("Fermentas")  
2 – рекомбінантний білок міні TyrRS після афінного виділення на Ni-NTA агарозі

Для дослідження каталітичних властивостей отриманої рекомбінантної міні TyrRS було проведено реакцію аміноацильовання очищеним ферментом специфі-

чною до нього гомологічною тРНК в сумарній тРНК, виділеній із дріжджів (рис. 3).

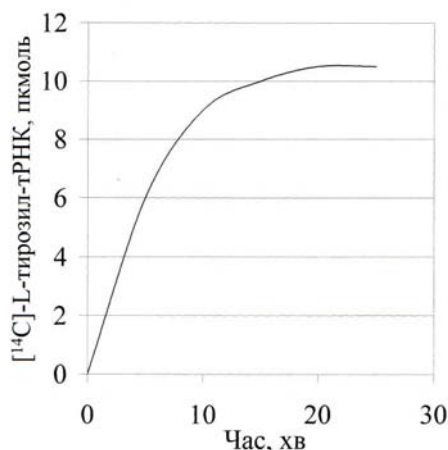


Рис. 3. Кінетика реакції аміноаціювання сумарної тРНК рекомбінантною міні тирозил-тРНК синтетазою

Унаслідок проведеної реакції отримано класичну кінетичну криву включення [<sup>14</sup>C] тирозину в тРНК. Це свідчить про експресію із клонованої послідовності міні TyrRS у векторі pET-23d(+) функціонально активного рекомбінантного білка, якому притаманні каталітичні властивості.

**Висновки.** У результаті проведеної роботи створено експресуючу плазмідну конструкцію pET-23d(+)-39KYRS, в якій клоновано послідовність N-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus*. Створена конструкція забезпечує експресію каталітично-активного ферменту.

#### Список використаних джерел:

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир. – 2002. – 589 с.
2. Demain A. L. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms / A. L. Demain, P. Vaishnav // Biotechnol. Adv. – 2009. – Vol. 27, № 3. – P. 297–306.
3. Adrio J. L. Recombinant organisms for production of industrial products / J. L. Adrio, A. L. Demain // Bioeng. Bugs. – 2010. – Vol. 1, № 2. – P. 116–131.
4. Sahdev S. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies / S. Sahdev, S. K. Khattar, K. S. Saini // Mol. Cell. Biochem. – 2008. – Vol. 307, № 2. – P. 249–264.
5. Rosano G. L. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges / G. L. Rosano, E. A. Cessarelli // Frontiers in Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–17.
6. Schimmel S. P. Aminoacyl-tRNA synthetase: general features and recognition of transfer RNAs / P. Schimmel // Ann. Rev. Biochem. – 1987. – Vol. 56. – P. 125–158.
7. Корнелюк А. И. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства / А. И. Корнелюк, И. В. Курочкин, Г. Х. Мацука // Молекулярная биология. – 1988. – Т. 22, № 1. – С. 176–186.
8. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase / A. I. Kornelyuk, M. P. Tas, A. Dubrovsky, C. J. Murray // Biopolymers and Cell. – 1999. – Vol. 15, № 2. – P. 168–72.
9. Wakasugi K. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase / K. Wakasugi, P. Schimmel // Science. – 1999. – Vol. 284, № 5411. – P. 147–151.
10. Induction of angiogenesis by the fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase / K. Wakasugi, B. M. Slike, J. Hood et al. // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, № 23. – P. 20124–20126.
11. Guo M. Essential nontranslational function of tRNA synthetases / M. Guo, P. Schimmel // Nature Chemical Biology. – 2013. – Vol. 9, № 3. – P. 145–153.
12. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells / A. Nishimura, M. Morita, Y. Nishimura, Y. Sugino // Nucl. Acids Res. – 1990. – Vol. 18, № 20. – P. 6169.
13. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. / J. Sambrook, T. Fritsch, T. Manniatis. – 2nd ed. – N. York: Cold Spring Harbor. – 1989.
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
15. Сайт-направленный мутагенез остатков лизина, локализованных в соединительном пептиде нуклеотидсвязывающего домена (свертки Россмана) тирозил-тРНК синтетазы из печени быка / В. Г. Найденов, М. И. Вудмаска, А. И. Корнелюк, Г. Х. Мацука // Биополимеры и клетка. – 2000. – Т. 16, № 4. – С. 275–280.
16. ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента кДНК, кодирующего нуклеотидсвязывающий домен тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих / О. В. Леванец, В. Г. Найденов, М. И. Вудмаска и др. // Биополимеры и клетка. – 1996. – Т. 12, № 5. – С. 66–70.
17. Studier F. W. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes / F. W. Studier, B. A. Moffatt // J. Mol. Biol. – 1986. – Vol. 189. – № 1. – P. 113–130.

#### References:

1. GliK B., Pasternak J. [Molecular Biotechnology. Principles and application]. M.: World; 2002. 589 p. In Russian.
2. Demain A., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv. 2009; 27(3): 297-306.
3. Adrio J., Demain A. Recombinant organisms for production of industrial products. Bioeng Bugs. 2010;1(2):116-31.
4. Sahdev S., Khattar S., Saini K. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol Cell Biochem. 2008;307(2):249-64.
5. Rosano G., Cessarelli E. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Frontiers Microbiology. 2014;5:1-17.
6. Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetase: general features and recognition of transfer RNAs. Ann Rev Biochem. 1987;56:125-158.
7. Kornelyuk A., Kurochkin I., Matsuka G. [Tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver. [Purification and physico-chemical properties]. Mol Biol. 1988;22(1):176-86. In Russian.
8. Kornelyuk A., Tas M., Dubrovsky A., Murray C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. Biopolymers and Cell. 1999;15(2):168-72.
9. Wakasugi K., Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. Science. 1999;284(5411):147-51.
10. Wakasugi K., Slike B., Hood J., Ewalt K., Cheres D., Schimmel P. Induction of angiogenesis by the fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. J Biol Chem. 2002;277(23):20124-6.
11. Guo M., Schimmel P. Essential nontranslational function of tRNA synthetases. Nat Chem Biol. 2013;9(3):145-3.
12. Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucl Acids Res. 1990;18(20):6169.
13. Sambrook J., Fritsch T., Manniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. N.York: Cold Spring Harbor; 1989.
14. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
15. Naidenov V., Vudmaska M., Kornelyuk A. [Site-directed mutagenesis of lysine residues located in the connection peptide of the nucleotide-binding domain (Rossman fold) of tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver]. Biopolymers and Cell. 2000;16(4):275-80. In Russian.
16. Levane O., Naidenov V., Vudmaska M., Matsuka G., Kornelyuk A. [PCR amplification, cloning and sequencing of cDNA fragment encoding a nucleoside binding domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase]. Biopolymers and Cell. 1996;12(5): 66- 70. In Russian.
17. Studier F., Moffatt B. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. J Mol Biol. 1986; 189(1):113-30.

В. Заец, канд. биол. наук, А. Цуварев, асп.,  
А. Корнелюк, чл.-кор. НАН Украины, д-р биол. наук, проф.  
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,  
Л. Коломиец, и.о. научн. сотр.  
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

### БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНОГО N-КОНЦЕВОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗЫ *B. TAURUS*

Проведено клонирование в экспрессирующий вектор pET23d(+) κДНК, кодирующую N-концевой каталитический модуль тирозил-тРНК синтетазы (мини TyrRS) *Bos taurus*. Экспрессировано в клетках *E. coli* BL21(DE3)pLysE и выделено высокоочищенный рекомбинантный белок мини TyrRS с использованием сконструированного экспрессирующего вектора pET-23d(+)39YRS для физико-химических исследований. Исследована каталитическая активность рекомбинантной мини TyrRS в реакции аминокислотирования гомологичной тРНК.

Ключевые слова: тирозил-тРНК синтетаза, мини TyrRS, клонирование, бактериальная экспрессия.

V. Zayets, PhD, O. Tsuvariev, PhD stud.,  
A. Kornelyuk, DSc., Prof., Corresponding Member of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,  
L. Kolomyets, research assistant  
Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Kyiv, Ukraine

### BACTERIAL EXPRESSION OF THE RECOMBINANT FUNCTIONALLY ACTIVE N-TERMINAL MODULE OF THE TYROSYL-tRNA SYNTHETASE *B. TAURUS*

The nucleotide sequence coding N-terminal module of *Bos taurus* tyrosyl-tRNA synthetase (mini TyrRS) was cloned into the bacterial expression vector pET23d(+). Bacterial expression of the recombinant protein mini TyrRS was performed in *E. coli* BL21 (DE3)pLysE cells with the use of the constructed vector pET-23d(+)39YRS for subsequent physical and chemical protein studies. The catalytic activity of the recombinant mini TyrRS has been studied in the aminoacylation reaction of homologous tRNA<sup>Tyr</sup>.

Key words: tyrosyl-tRNA synthetase, mini TyrRS, cloning, bacterial expression.

УДК 616.379-008.64.8-085.2/3

Н. Нікітіна, асп., С. Береговий, канд. біол. наук,  
Л. Степанова, канд. біол. наук, О. Кабанов, пров. інженер  
ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

### ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНОЇ СХЕМИ ВВЕДЕННЯ КОКАРНІТУ ЩУРАМ ІЗ ДІАБЕТИЧНОЮ ПОЛІНЕЙРОПАТІЄЮ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕНЗОАЛГОМЕТРИЧНОГО МЕТОДУ

Досліджено зміну больового порога у щурів із діабетичною полінейропатією та ефективність Кокарніту при лікуванні цього ускладнення діабету та визначено оптимальну схему введення препарату. Установлено, що щоденне введення препарату протягом 9 та 12 днів позитивно впливає на нервову провідність та повертає до норми реакцію на больовий стимул.

Ключові слова: поріг больової чутливості, діабетична полінейропатія, Кокарніт.

**Вступ.** Велика соціальна значущість цукрового діабету полягає в тому, що він призводить до ранньої інвалідизації й летальності, обумовлених ускладненнями діабету: мікроангіопатії, макроангіопатії, нейропатії. Діабетична периферична полінейропатія є найпоширенішим ускладненням цукрового діабету [23] і причиною низької якості життя, порушення працездатності у великої кількості хворих [16]. Приблизно 10 % пацієнтів мають нейропатію в той час, коли діабет діагностується вперше, і більше, ніж у половини людей із цукровим діабетом розвивається полінейропатія через 25 років [17]. Ознаками розвитку полінейропатії є оніміння, аллодінія, м'язова слабкість, парестезії. Також порушується температура, тактильна і больова чутливість.

Механізм розвитку діабетичної полінейропатії описується різними теоріями, серед яких набряк і дегенерація нервових волокон [1]; посилення активності поліолового циклу і, як наслідок, накопичення сорбітолу [2], недостатність міоїнозитола [13]; порушення ліпідного обміну, посилення перекисного окиснення ліпідів [12]; неферментативне глікозильовання білків; метаболічний стрес, унаслідок якого відбувається підвищене утворення вільних радикалів [10]. Вважається, що гіперглікемія є основним фактором патогенезу діабетичних ускладнень і зумовлює метаболічні та структурні зміни в центральній і периферичній нервових системах.

Основну перевагу в терапії діабетичної полінейропатії надають засобам патогенетичної спрямованості. Патогенетична терапія полягає у призначенні антиок-

сидантів і метаболічних засобів [18, 1]. Показано деяку ефективність вітамінів групи В у лікуванні діабетичної полінейропатії як при введенні одного вітаміну [25, 26], так і при використанні комплексу вітамінів В [22]. Однак, правильна комбінація вітамінів В, доза, тривалість лікування не є повністю зрозумілими [11]. Серед ряду препаратів нашу увагу привернув новий препарат Кокарніт (World Medicine), який, за даними літератури, позитивно впливає на метаболічні, репаративні процеси, поліпшує трофіку нервової тканини, має знеболювальний, судинорозширювальний ефект [8, 4] та містить не лише вітаміни групи В, а й метаболічні речовини, що покращують нервову провідність. Препарат має широкий спектр дії, використовується для лікування різних патологічних станів нервової системи [6, 3, 9]. До складу препарату входить 20 мг нікотинамід, 50 мг кокарбоксилази, 500 мкг ціанкобаламіну, 10 мг динатрію аденозинтрифосфату тригідрату (АТФ).

Нікотинамід (вітамін В<sub>3</sub>) бере участь в окисно-відновних процесах у клітині, тканинному диханні, гліколізі, поліпшує метаболізм жирів, протеїнів, амінокислот, пуринів. Кокарбоксилаза (кофермент вітаміну В<sub>1</sub>) каталізує карбоксилювання й декарбоксилювання α-кетокислот, відіграє важливу роль у вуглеводному обміні, сприяє засвоєнню глюкози. Ціанкобаламін (вітамін В<sub>12</sub>) потрібний для нормального функціонування кровотворних органів, підвищує здатність тканин до регенерації, синтезу й накопичення білка в організмі, активізує обмін вуглеводів і ліпідів. Функція АТФ поля-