

На правах рукописи

ЗАКАТАЕВА НАТАЛИЯ ПАВЛОВНА

**ПРИМЕНЕНИЕ СТРАТЕГИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ
ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ
ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ПУРИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
НА ОСНОВЕ *BACILLUS***

1.5.7 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук**

Москва 2022

Работа выполнена в Акционерном Обществе «Научно-исследовательский институт Аджиното-Генетика» (АО «АГРИ»)

Научный консультант:

Лившиц Виталий Аркадьевич
доктор биологических наук, профессор,
Профессор Геномного Центра "Развитие генетических
технологий для промышленной микробиологии";
Курчатовский комплекс генетических исследований (ГосНИИГенетика)
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва

Официальные оппоненты:

Мирошников Анатолий Иванович
доктор химических наук, академик РАН,
Научный руководитель направления «Биотехнология»
заведующий отделом Биотехнологии;
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, г. Москва

Манухов Илья Владимирович
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией молекулярной генетики,
заместитель заведующего кафедры биофизики;
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)», г. Москва

Костюк Светлана Викторовна
доктор биологических наук, доцент,
заведующая лабораторией молекулярной биологии,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
(ФГБНУ «МГНЦ»), г. Москва

Ведущая организация:

Национальный исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи
(НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2022 года.

Учёный секретарь Диссертационного Совета,
Доктор биологических наук

Горячева И. И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. Пуриновые нуклеотиды играют важную роль в физиологии клетки, участвуя в таких ключевых процессах, как синтез нуклеиновых кислот, макроэргов, кофакторов, витаминов и аминокислот. Инозинмонофосфат (ИМФ) и гуанозинмонофосфат (ГМФ), а также другие пуриновые соединения используют в пищевой промышленности и медицине в качестве пищевых добавок и лекарственных препаратов, соответственно. Так, ИМФ и ГМФ являются естественными факторами усиления вкуса умами (*umami*) и применяются в сочетании с глутаматом натрия для его усиления, а также для улучшения принятия диет с низким содержанием соли. Другие пурины, например, инозин, гуанозин и 5-амино-4-имидазолкарбоксамид 2'-рибонуклеозид (AICAr) положительно воздействуют на важные клеточные функции и применяются для лечения метаболического синдрома, лечения ожирения и резистентности к инсулину, профилактики диабета 2 типа, специфической индукции апоптоза в В-клетках; ослабления ишемии, ингибирования пролиферации раковых клеток, а также в качестве антиоксидантов и нейромедиаторов. Некоторые производные нуклеозидов используют в качестве сильнодействующих противовирусных препаратов и химиотерапевтических агентов. Метаболическое производное гуанозинтрифосфата (ГТФ), рибофлавин или витамин В2, не синтезируется в клетках человека и животных и является необходимым элементом питания, а также используется в качестве медицинского препарата для восстановления двигательных функций пациентов с болезнью Паркинсона и лечения лактоацидоза. Потребность в промышленном производстве пуринов постоянно растет. Так в 2019 году мировой рынок нуклеотидов составил 501,1 млн. долларов США, а к 2022 году он достигнет уже 809,3 млн. долларов США. В области производства нуклеотидов конкурируют несколько промышленных производителей, наиболее крупными из которых являются Ajinomoto Co., Inc. (Япония), Takeda (Япония), CJ Cheil Jedang Co. (Южная Корея), Inc. Daesang Co. (Южная Корея) и Star Lake Bioscience Co. (КНДР). В настоящее время пуриновые нуклеотиды и нуклеозиды получают методом ферментации в биореакторах с использованием штаммов-продуцентов на основе *Corynebacterium* или *Bacillus*.

Данная работа была выполнена в лаборатории АО (ранее ЗАО) «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (сокращенно АО «АГРИ»), который является научным подразделением фирмы Ajinomoto Co., Inc. Одно из направлений исследований лаборатории – получение и совершенствование штаммов-продуцентов инозина и гуанозина на основе бактерий рода *Bacillus* для промышленных производств. Работа посвящена разработке новых подходов к конструированию высокоэффективных продуцентов пуриновых производных, в частности, пуриновых нуклеозидов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*. Важной задачей являлось повышение накопления и выхода целевого продукта в ферментации на глюкозо-содержащем сырье.

Долгое время штаммы-продуценты пуриновых нуклеозидов получали и улучшали с помощью мутагенеза и традиционной селекции с использованием скрининга на средах, содержащих токсичные аналоги метаболитов. Однако этот подход способствовал накоплению в хромосоме нежелательных мутаций, негативно

влияющих на скорость роста и другие биотехнологические характеристики штаммов, а, главное, не позволял получать направленные изменения метаболических потоков, а значит создавать высокоэффективные продуценты с заданными свойствами.

Решить эту задачу позволяют современные методы метаболической инженерии. Метаболическая инженерия – это улучшение клеточной активности (например, усиление синтеза целевого продукта) путем изменения ферментативных, транспортных и регуляторных функций клетки с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Этот подход основывается на изучении геномов, анализе метаболических потоков, транскрипционном анализе, изучении белковых продуктов клетки и требует совершенствования технологий для введения генно-инженерных модификаций.

Несмотря на то, что первые шаги по получению рекомбинантных штаммов бацилл были сделаны десятки лет назад, методы генной инженерии, доступные для *B. subtilis* и особенно для *B. amyloliquefaciens*, все еще намного менее эффективны, чем, например, инструментарий, разработанный для граматрицательной бактерии *Escherichia coli*. Поэтому они продолжают активно совершенствоваться различными исследователями и в настоящее время.

Опубликован ряд работ, описывающих генно-инженерные подходы к конструированию бесплазмидных рекомбинантных штаммов *B. subtilis*, и в меньшей степени, *B. amyloliquefaciens*. Поскольку штаммы бацилл обладают относительно высокой природной способностью к эффективной гомологичной рекомбинации, множество известных методов конструирования штаммов бацилл основаны на использовании одиночного или двойного кроссингвера с использованием селекции и контрселекции для отбора интегрантов после встраивания плазмиды и ее выщепления, соответственно. Были также разработаны и методы, основанные на еще более эффективных гетерологичных рекомбинационных системах, позволяющих существенно повысить частоту рекомбинации и облегчить отбор мутантных клонов, а также на основе современных технологий редактирования геномов, таких как CRISPR/Cas.

Однако перечисленные выше методы генной инженерии бацилл не всегда применимы для задач конструирования штаммов-продуцентов нуклеозидов из-за необходимости получать «бесшовные» рекомбинантные штаммы и низкой эффективности существующих методов введения генетического материала в клетки *Bacillus*, которая не позволяет достигать необходимых частот для отбора рекомбинантных клонов.

Если для штаммов *B. subtilis* дикого типа была показана возможность природной трансформации компетентных клеток, то многие штаммы-продуценты на основе *B. subtilis*, и в особенности *B. amyloliquefaciens*, включая штаммы *B. amyloliquefaciens* K, на основе которых разрабатываются продуценты нуклеозидов, используемые в промышленном производстве, не имели или утратили такую способность.

В начале эры генной инженерии бацилл основным подходом для конструирования промышленно значимых штаммов было использование плазмидных векторов, обеспечивающих необходимый уровень экспрессии целевых генов. Однако такие штаммы зачастую характеризовались генетической

нестабильностью. Кроме того, из-за вводимых в последние годы законодательных ограничений одним из важных требований к промышленным штаммам является запрет на присутствие в их клетках плазмид, генов устойчивости к различным антибиотикам, а в ряде случаев также и фрагментов чужеродной ДНК.

Поэтому задачей данных исследований стал поиск подходов и стратегий метаболической инженерии технологически стабильных и экономически эффективных, бесплазмидных, немаркированных штаммов бацилл – продуцентов пуриновых нуклеозидов, инозина и гуанозина, для биотехнологической промышленности.

Публикация нуклеотидных последовательностей геномов *B. subtilis* 168 и *B. amyloliquefaciens* FZB42, а также последующие исследования транскриптома и метаболома *B. subtilis* и появление современных баз данных, объединяющих биохимические реакции, регуляторные сети и метаболические пути с геномом *B. subtilis* (BsubCyc, DBTBS, SubtiWiki и др.), заложили хорошую основу для развития метаболической инженерии продуцентов пуриновых нуклеозидов на основе близкородственной бактерии *B. amyloliquefaciens* K.

Стратегии создания продуцентов нуклеозидов, которые были применены в работе:

- разработка удобного инструментария для введения генетического материала в клетки *B. amyloliquefaciens* и получение немаркированных генетических модификаций хромосомы методами генной инженерии;

- поиск и реализация ключевых изменений метаболизма для усиления биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*;

- поиск генов и оптимизация их экспрессии для обеспечения конверсии (дефосфорилирования) пуриновых нуклеотидов в нуклеозиды;

- изучение генетических основ транспорта пуриновых соединений из клетки с целью увеличения накопления пуриновых нуклеозидов в среде культивирования.

Следует указать, что все исследования данной работы были проведены нами с использованием некоммерческих штаммов *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *E. coli*, способных накапливать лишь небольшие количества инозина и/или гуанозина, или акадезина (AICAr), или рибофлавина, которые мы назвали модельными продуцентами. Хотя в работе и не приведены эти данные, важно отметить, что найденные подходы метаболической инженерии для улучшения штаммов-продуцентов инозина и гуанозина применялись также и для промышленных штаммов *B. amyloliquefaciens* K. Кроме того, благодаря идентификации нескольких генов экспорта нуклеозидов, а также генов 5'-нуклеотидаз, изучению регуляции экспрессии этих генов и биохимической характеристике их белковых продуктов, исследования по теме диссертации расширяют знания о генетическом контроле и регуляции метаболизма у бактерий.

Цель и задачи исследования. С целью разработки и применения стратегий метаболической инженерии для генетического конструирования эффективных продуцентов пуриновых соединений на основе штаммов *Bacillus*, *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* были поставлены следующие основные **задачи**:

1. Создать удобный генетический инструментарий для внесения немаркированных генно-инженерных модификаций в хромосомы плохо трансформируемых штаммов-продуцентов *B. amyloliquefaciens* и родственных бацилл;

2. Выявить ключевые подходы для изменения генетической регуляции метаболизма бактерий с целью усиления биосинтеза и накопления пуриновых соединений в среде культивирования.

Научная новизна и практическая ценность работы. Разработанный в ходе этого исследования простой, быстрый и надежный метод введения направленных немаркированных модификаций хромосомы клеток *B. amyloliquefaciens* и родственных бактерий был применен автором и его коллегами в АО «АГРИ» при конструировании различных штаммов-продуцентов на основе этих бактерий. Этот метод также активно используется в ряде отечественных и зарубежных лабораторий для изучения метаболизма и создания различных продуцентов на основе штаммов бактерий, о чем свидетельствуют многочисленные отечественные и международные публикации.

В ходе исследования были выявлены и применены ключевые подходы к созданию эффективных продуцентов пуриновых нуклеозидов. Они включают а) усиление биосинтеза пуринов *de novo* путем снятия негативной регуляции конечными продуктами этого пути как на уровне транскрипции генов пуринового оперона, так и на уровне активности фермента фосфорибозилпирофосфатсинтетазы (PRPP-синтетазы), который катализирует образование непосредственного предшественника биосинтеза пуриновых нуклеотидов; б) усиление процесса конверсии нуклеотидов в нуклеозиды, а также в) активацию транспорта (эфлюкса) нуклеозидов из клетки. Были получены перспективные для биотехнологии мутации, приводящие к свехэкспрессии генов биосинтеза пуринов и снятию ингибирования PRPP-синтетазы. Показано, что увеличение уровня экспрессии найденных генов 5'-нуклеотидаз позволяет усилить дефосфорилирование не только пуриновых нуклеотидов, но и некоторых их метаболических предшественников – 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1- β -D-рибофуранозил 5'-монофосфата (AICAR) и производных – флавиномононуклеотида, (FMN), повышая таким образом продукцию биотехнологически важных метаболитов, пуриновых нуклеозидов, AICAR и рибофлавина. В ходе выполнения настоящей работы найдены и охарактеризованы несколько новых генов *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *E. coli* и впервые изучены биохимические свойства их продуктов – белков дефосфорилирования нуклеотидов и эфлюкса нуклеозидов, что позволило предсказать их физиологическую функцию в клетках. В ходе работы впервые изучена регуляция экспрессии генов, кодирующих 5'-нуклеотидазу YutF и белок эфлюкса NepI.

Важно отметить, что сконструированные с применением найденных подходов метаболической инженерии промышленные штаммы-продуценты инозина и гуанозина на основе *B. amyloliquefaciens* используются Ajinomoto Co., Inc. для коммерческого производства этих соединений, обеспечивая высокую конкурентоспособность применяемой технологии. Таким образом, представленные в работе данные имеют как научную, так и практическую значимость.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оптимизация условий электротрансформации и разработка на основе термочувствительной по репликации плазмиды простого и эффективного метода замещения аллелей рекомбинацией позволили направленно редактировать геномы

плохо трансформируемых промышленно значимых штаммов бацилл, *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*.

2. Мутации $taAGat \rightarrow taGAat$ в -10 области промотора и делеция последовательности гуанинового рибопереклочателя в 5'-нетранслируемой области первого гена пуринового оперона усиливают экспрессию генов оперона и увеличивают накопление пуриновых нуклеозидов у штаммов *Bacillus*.

3. Мутации N120S и L135I в PRPP-синтетазе из *B. amyloliquefaciens* придают ферменту устойчивость к ингибированию ADP и GDP, а также усиливают его активацию при более низких концентрациях неорганического фосфата. Введение соответствующих замен в ген *prs* на хромосоме штаммов-продуцентов инозина и гуанозина на основе *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* приводит к заметному увеличению продукции нуклеозидов.

4. Применение селекции на устойчивость к пуриновым нуклеозидам в специально сконструированном чувствительном штамме *E. coli* позволяет выявлять новые гены, обеспечивающие дефосфорилирование нуклеотидов, а также гены, участвующие в активном транспорте пуриновых нуклеозидов из клетки.

5. Гены *utF*, *ytU* и *yueE* из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* кодируют 5'-нуклеотидазы YutF и YitU с широкой субстратной специфичностью, и фосфодиэстеразу YueE, соответственно. YitU участвует в биосинтезе рибофлавина из FMN. Ген *utF* входит в состав оперона *utDEF* и его экспрессия подвержена положительной авторегуляции, усиливающейся в присутствии неорганического фосфата.

6. Способность к накоплению пуриновых нуклеозидов, инозина и гуанозина, а также AICAr и рибофлавина зависит у штаммов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* от уровня экспрессии гена *ytU*. Делеция гена приводит к резкому снижению, а амплификация повышает накопление пуриновых нуклеозидов, рибофлавина и AICAr.

7. Гены *nepI* (*yicM*) из *E. coli* и *pbuE* (*ydhL*) из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* участвуют в экспорте пуриновых нуклеозидов. Экспрессия *nepI* усиливается при росте клеток на минимальной среде M9, а также в стационарной фазе роста. Индукция аденином зависимой от рибопереклочателя экспрессии *pbuE* сохраняется в неродственном организме *E. coli*.

8. Амплификация генов *nepI* и *pbuE* усиливает экскрецию пуриновых нуклеозидов как в нативном организме, так и в неродственных бактериях.

Место проведения работы, личный вклад автора и благодарности. Основные результаты исследований, изложенные в диссертации, получены автором в АО (ранее ЗАО) «АГРИ» лично или под его непосредственным руководством (планирование экспериментов, анализ и обсуждение результатов, подготовка, написание и редактирование статей и патентных заявок) в соавторстве с сотрудниками АО «АГРИ», фамилии которых представлены в соответствующих публикациях. Автор благодарит всех коллег из АО «АГРИ», с которыми имела счастье работать на разных этапах выполнения данной работы, за дружеское и профессиональное участие в этих и многих других исследованиях и за ту уникальную, демократичную, рабочую и честную атмосферу, которую они создали все вместе и которая живет в АО «АГРИ».

Апробация работы. Материалы работы неоднократно докладывались автором на научных семинарах АО «АГРИ» и совместных с фирмой Ajinomoto Co., Inc. (Япония) научных конференциях в период с 2005 по 2018 гг., а также были представлены в виде докладов и стендовых сообщений на международных и всероссийских конференциях, включая: IX Congress of Bacteriology and Applied Microbiology “TUMS 1999”, Сидней, Австралия, 1999; III Съезд ВОГиС "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития", Москва, 2004; Международную школу-конференцию «Генетика микроорганизмов и биотехнология», Москва-Пушино, 2008; 3th International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology “BioMicroWorld 2009”, Лиссабон, Португалия, 2009; XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology “TUMS 2011”, Саппоро, Япония, 2011; 15th International Biotechnology Symposium “15th IBS”, Дегу, Южная Корея, 2012; 16th International Biotechnology Symposium & Exhibition (IBS 2014), Форталеза, Бразилия, 2014; V Съезд Биохимиков России, Сочи, Россия, 2016; 19th International Conference on Bacilli & Gram-Positive Bacteria, Берлин, Германия, 2017; 15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Сингапур, 2017; Metabolic Engineering 12, Мюнхен, Германия, 2018; International Conference “Advanced Microbiology 2018”, Лондон, Великобритания, 2018. Апробация работы состоялась на межлабораторном семинаре АО «АГРИ» 4 августа 2022 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 19 международных и российских патентов и заявок на изобретение, 10 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, методы и материалы исследования, результаты и обсуждения, заключение, выводы и список цитируемой литературы, состоящий из 312 источников. Работа изложена на 196 страницах, включает 68 рисунков и 26 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1.1. Создание генно-инженерного инструментария для рационального конструирования промышленно значимых штаммов *Bacillus*

К моменту начала исследований по теме диссертации в начале 2000-х годов штаммы-продуценты на основе *B. subtilis* и, в особенности, *B. amyloliquefaciens*, в основном получали методами традиционной селекции, тогда как методы генной инженерии, позволяющие получать направленные генные модификации хромосомы этих бактерий, были мало разработаны. Поэтому создание удобного инструментария для внесения множественных мутаций в хромосомы этих бактерий методами генной инженерии являлось актуальной задачей.

Важным этапом получения направленных хромосомных мутаций является введение генетического материала в клетки. Штаммы *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* обладают множественными системами рестрикции-модификации, состоящими из ферментов рестрикции, эндонуклеаз, и ферментов модификации, ДНК-метилтрансфераз. Эти системы служат защитным барьером от проникновения в клетку чужеродной ДНК, метилированной по другому типу. Это осложняло применение генно-инженерных подходов к редактированию геномов этих бактерий, и делало методы получения рекомбинантных штаммов длительными и

трудоемкими. Промышленные штаммы-продуценты нуклеозидов на основе *B. amyloliquefaciens* K, а также их предшественники, штаммы IAM1523 (штамм дикого типа) и AJ1991 (модельный продуцент пуриновых нуклеозидов), с которыми велась работа в нашей лаборатории, практически не обладали природной компетентностью, а наши неоднократные попытки введения в них ДНК с помощью электротрансформации не были успешными. Необходимо также отметить, что поскольку промышленные продуценты не должны содержать маркеры устойчивости к антибиотикам, но при этом вести себя стабильно в условиях биотехнологических производств, все изменения в метаболизме продуцентов важно было достигать исключительно путем направленных немаркированных генетических модификаций хромосомы.

Разработка генно-инженерного инструментария для конструирования не обладающих природной компетентностью штаммов *B. amyloliquefaciens* проводилась нами с учетом перечисленных требований и обстоятельств. Поскольку для многих видов *Bacillus*, и особенно для промышленных штаммов *B. amyloliquefaciens*, введение ДНК остается фактором, ограничивающим генетические манипуляции, эту работу мы начали с подбора и оптимизации условий введения генетического материала в клетки *B. amyloliquefaciens* K.

1.1.1. Оптимизация условий введения генетического материала в нетрансформируемые штаммы *Bacillus*

В качестве инструмента для введения плазмидной ДНК, выделенной из *E. coli*, напрямую в не обладающие природной компетентностью клетки *B. amyloliquefaciens* K мы решили воспользоваться электротрансформацией. В ходе проведения экспериментов стало понятно, что условия повышения эффективности электротрансформации для конкретных штаммов необходимо подбирать индивидуально. Наиболее важными оказались не только условия выращивания и обработки клеток перед введением ДНК (среда культивирования, фаза роста, величина напряженности электрического поля), а также размер и механизм репликации донорных плазмид, но и условия последующей регенерации клеток, которые определяют их выживаемость после применения электрического импульса. Подбору этих условий мы уделили особое внимание.

Для улучшения процесса регенерации клеток трансформантов мы применили несколько подходов: культивирование клеток в присутствии осмопротекторов (среда для регенерации на основе LB содержала 0,5 М сорбита, 0,5 М маннита, 10% глицерина (об./об.) и 7,5% бетаина (мас./об.)), бережное перемешивание и высев клеток на селективные чашки без концентрирования центрифугированием. Это позволило дополнительно повысить эффективность электротрансформации.

Чтобы избежать деградации ДНК в клетке *B. amyloliquefaciens* под действием системы рестрикции-модификации, донорную плазмидную ДНК обрабатывали *in vitro* коммерческим препаратом метилтрансферазы *Bam*HI или, для получения ДНК, метилированной *in vivo* по типу *B. amyloliquefaciens*, была сконструирована вспомогательная плазида рОК12-Met, содержащая 4 гена ДНК-метилтрансфераз из *B. amyloliquefaciens* K. Этот подход позволил почти на порядок увеличить число трансформантов по сравнению с метилированием *in vitro* (Таблица 1).

Комбинация описанных выше подходов позволила осуществить передачу генетического материала в клетки *B. amyloliquefaciens* AJ1991 с частотой не менее 1×10^3 трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК (Таблица 1). Эти частоты были ниже, чем соответствующие частоты трансформации, например, штаммов *B. subtilis*, но впервые давали возможность передавать плазмиды, сконструированные в *E. coli*, напрямую в *B. amyloliquefaciens*. Необходимо также отметить, что оптимизированный метод электротрансформации был довольно универсальным и позволял передавать генетический материал и в другие виды бацилл (Таблица 1).

Таблица 1. Частоты электротрансформации клеток различных видов бацилл.

| Штамм-реципиент | Количество трансформантов |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>B. amyloliquefaciens</i> AJ1991 | 1×10^3 * (3×10^2) |
| <i>B. cereus</i> B 1274 (ATCC 11778) | 6×10^3 |
| <i>B. licheniformis</i> B 1746 | 4×10^3 |
| <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> ATCC 35646 | 8×10^3 |
| <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> B 5156 | 8×10^3 |
| <i>B. intermedius</i> B 3074 | 2×10^4 |

*Количество трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК, выделенной из клеток *E. coli*, содержащих рОК12-Met. В скобках указана частота электротрансформации с использованием плазмидной ДНК, обработанной *Bam*HI метилтрансферазой.

1.1.2. Разработка метода введения немаркированных хромосомных генетических модификаций штаммов *Bacillus*

Хотя оптимизированный протокол электротрансформации и позволял надежно вводить плазмидную ДНК в клетки даже нетрансформируемых штаммов бацилл, частоты электротрансформации все-таки были недостаточно высокими, чтобы напрямую отбирать целевые генетические модификации хромосомы (замещение аллелей) как результат гомологичной рекомбинации соответствующих участков ДНК плазмиды и хромосомы.

Чтобы решить эту проблему, мы предложили разбить процесс получения немаркированных мутаций в хромосоме на несколько этапов: 1) введение в клетку плазмиды для доставки целевых мутаций в хромосому и отбор трансформантов; 2) две последовательные стадии гомологичной рекомбинации между участками ДНК плазмиды и хромосомы (первый кроссинговер, позволяющий плазмиде целиком встроиться в хромосому, и второй кроссинговер, завершающийся выщеплением плазмиды и появлением в хромосоме мутации или сохранением ДНК дикого типа) и 3) отбор рекомбинантных клонов с целевой мутацией. Для того чтобы разделить этапы введения плазмиды для доставки генетических модификаций и ее встраивания в хромосому, удобно использовать термочувствительные по репликации вектора.

Мы изучили возможность применения термочувствительного по репликации репликона вектора рG⁺host для отбора рекомбинантных клонов штаммов бацилл без использования фенотипической селекции для отбора хромосомных мутаций. Предполагалось, что репликация полученной нами на основе этого репликона плазмиды рNZT1 по типу катящегося кольца должна была обеспечить очень высокую частоту рекомбинации между хромосомным геном-мишенью и

гомологичной последовательностью на плазмиде. Вектор, pNZT1, имел небольшой размер (4 т. п. н.), реплицировался в штаммах *E. coli* и *Bacillus* при температурах не выше 30 °С, обеспечивал селекцию клонов с плазмидой на средах с эритромицином и содержал многочисленные уникальные сайты рестриктаз для клонирования целевых ДНК-фрагментов. Плазмиды для доставки необходимых генетических модификаций (делеций, вставок или точечных мутаций) на основе pNZT1 конструировали в клетках *E. coli* так, чтобы мутация была фланкирована последовательностями длиной порядка 150 – 300 п. н., обеспечивающими гомологичную рекомбинацию с соответствующими участками хромосом штаммов *Bacillus* во время интеграции и вырезания плазмиды.

Получение генетических модификаций хромосомы штаммов бацилл с помощью предложенного в работе метода схематически изображено на Рис. 1, А. После введения плазмиды для доставки целевой модификации в реципиентный штамм процедура замещения аллелей рекомбинацией состояла из нескольких этапов. На первом этапе плазмидный штамм культивировали с аэрацией в богатой среде (LB) при 37 °С (недопустимая температура для репликации плазмиды), что инициировало интеграцию всей плазмиды в хромосому посредством одиночного кроссинговера между целевым геном и гомологичной последовательностью на плазмиде. На втором этапе отдельный клон интегранта культивировали с аэрацией в LB при 30 °С в течение 48 часов, при этом происходил второй одиночный кроссинговер и вырезание плазмиды, приводящее к образованию чувствительных к эритромицину (Em^S) клонов с родительским или мутантным аллелем в хромосоме (Рис. 1, А).

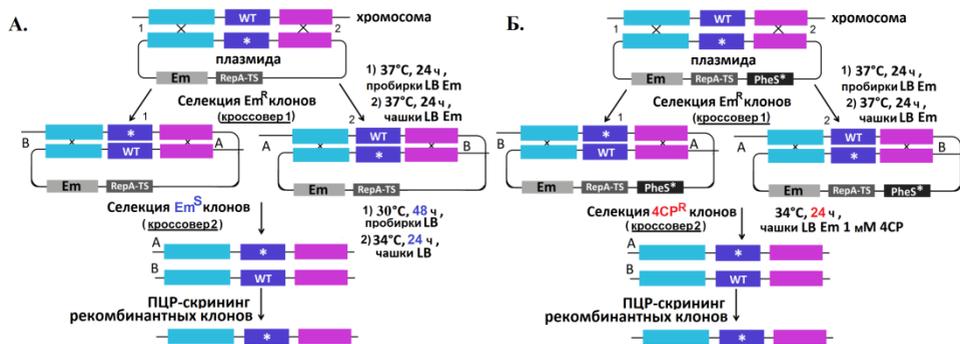


Рис. 1. Схематическое изображение процедуры замещения аллелей методом двухстадийной рекомбинации: **А**, базовый метод; **Б**, модификация метода с использованием маркера контрселекции. Генетическая модификация (делеция, точечная мутация или вставка) показана звездочкой. WT обозначает последовательность дикого типа. Перечеркнутые линии обозначают альтернативные одиночные кроссинговеры (1 или 2 и А или В).

Отбор рекомбинантных клонов проводили с помощью ПЦР-анализа ДНК из колоний. Делции и вставки различали по разнице в размерах продуктов ПЦР. Для отбора клонов с точечной мутацией мы предложили специальную методику ПЦР-анализа, основанную на свойстве Taq ДНК-полимеразы неэффективно

удлинять праймер, если его 3'-концевой нуклеотид не комплементарен матрице. Для поиска клонов с заменой для каждого рекомбинантного клона после выщепления плазмиды выполняли две независимые ПЦР-амплификации с использованием Taq ДНК-полимеразы и пар праймеров W (test-com/test-w) и M (test-com/test-m), специфичных для последовательности дикого или мутантного типа, соответственно (Рис. 2, А). Общий праймер test-com был полностью комплементарен матрице, тогда как test-w и test-m отличались 3'-концевым нуклеотидом (родительский или мутантный). Для большего ослабления комплементации при несовпадении 3'-концевого нуклеотида мы дополнительно вносили в последовательность праймера некомплементарный (одинаковый для обоих праймеров) нуклеотид в позиции, соседней с 3'-концевой. Последующий анализ количества полученных ПЦР-продуктов для этих двух ПЦР-амплификаций с одним и тем же клоном в качестве матрицы позволял четко различать клоны дикого и мутантного типов (Рис. 2, Б), что обеспечивало быстрый и эффективный отбор рекомбинантных клонов, содержащих замены нуклеотидов, включая одиночные.



Рис. 2. Скрининг генетических модификаций с помощью ПЦР-анализа колоний. Слева и справа сверху: схематическое изображение отжига пар праймеров test-com/test-w и test-com/test-m на матрице хромосомной ДНК дикого или мутантного типа (мутация отмечена красной звездочкой). Справа внизу: электрофорез продуктов ПЦР (4 мкл) в агарозном геле; **m**: ДНК-маркер 1 т. п. н. (Fermentas). Две независимые ПЦР-амплификации были выполнены для каждой колонии с использованием пар праймеров **W** (test-com/test-w) и **M** (test-com/test-m). Дорожки 1, 2: клоны, содержащие мутацию; дорожка 3: клон дикого типа.

Частота интеграции термочувствительной плазмиды для доставки генетических модификаций в хромосому, рассчитанная как отношение количества устойчивых к эритромицину (Em^R) клеток к количеству жизнеспособных клеток, составляла от 10^{-4} до 10^{-2} . Частота второго одиночного кроссинговера и вырезания плазмиды, которую оценивали как процент чувствительных к эритромицину клеток, составляла от 1 до 99%. Таким образом, как мы и ожидали, замещающая рекомбинация происходила с очень высокой частотой, что позволяло легко выбирать желаемые генетические модификации с помощью ПЦР-скрининга. Однако в редких случаях, как правило, связанных с метаболической нагрузкой на клетки, возникающей в результате целевой генетической модификации, отбор рекомбинантных клонов как результат выщепления плазмиды из хромосомы мог быть затруднен. В этих случаях к недостаткам разработанного метода замещения

аллелей с помощью двухстадийной рекомбинации можно отнести относительно трудоемкий отбор рекомбинантов, которые выщепили плазмиду в результате второго кроссинговера. Поэтому мы предложили усовершенствовать этот этап отбора клонов путем применения маркера для контрселекции.

1.1.3. Модификация метода замещения аллелей путем применения маркера контрселекции

Известно, что α -субъединица *E. coli* фенилаланил-тРНК лигазы (синтетазы) PheS, содержащая мутацию A294G (Рис. 3), ошибочно связывает аналог фенилаланина 4-хлор-DL-фенилаланин (4CP), который, включаясь в белки во время трансляции, вызывает гибель клеток. Это свойство может быть использовано для отбора клонов, утративших ген *pheS**, кодирующий мутантный фермент, по росту на среде с 4CP. К моменту нашего поиска удобного маркера для контрселекции ген *pheS** из *B. subtilis*, который кодирует PheS с мутацией A309G (*pheS*_{BsA309G}) (соответствующей мутации A294G в белке из *E. coli* (Рис. 3)), был применен для отбора клонов *Listeria monocytogenes* и *B. amyloliquefaciens*. Однако маркер *pheS*_{BsA309G} характеризовался довольно низкой эффективностью отбора, что привело к необходимости использовать для селекции минимальную или полубогатую среду с относительно высокими концентрациями дорогостоящего реактива 4CP (> 5 мМ).

| | | |
|-----------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | * |
| Eco wt | 237 | EDLQIRFRPSYFPFTEPSAEVDVM-----GKNGKWL EV LGCGMVHPNVL RNV GI |
| Eco T251S/A294G | 237 | EDLQIRFRPSYFPFSEPSAEVDVM-----GKNGKWL EV LGCGMVHPNVL RNV GI |
| BS wt | 241 | QDREIRLRPSFFPFT EPS VEVDVTCFKCGGQGC SVCKKTGW E TL LGAGMVHPNVL KMAG F |
| BS A309G | 241 | QDREIRLRPSFFPFT EPS VEVDVTCFKCGGQGC SVCKKTGW E TL LGAGMVHPNVL KMAG F |
| BS T255S/A309G | 241 | QDREIRLRPSFFPFS EPS VEVDVTCFKCGGQGC SVCKKTGW E TL LGAGMVHPNVL KMAG F |
| | | * |
| Eco wt | 286 | DPEVYSGF AF FGMG VER I AML KY GED IRHFYTNDVRF IS QFKQ A -- |
| Eco T251S/A294G | 286 | DPEVYSGF AF FGMG VER I AML KY GED IRHFYTNDVRF IS QFKQ A -- |
| BS wt | 301 | NPEEYQGF AF FGMG VER I AML KY GED IRHFYTNDVRF IS QFKQ A |
| BS A309G | 301 | NPEEYQGF AF FGMG VER I AML KY GED IRHFYTNDVRF IS QFKQ A |
| BS T255S/A309G | 301 | NPEEYQGF AF FGMG VER I AML KY GED IRHFYTNDVRF IS QFKQ A |

Рис. 3. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей С-концевых областей белков PheS с помощью программы CLUSTALW. Обозначения: **Eco** и **Bs**, белки из *E. coli* и *B. subtilis*, соответственно; **wt**, PheS дикого типа; Консервативные аминокислотные остатки выделены цветом: желтым – идентичные, а зеленым – похожие. Позиции замен аминокислот в белках показаны красным цветом и отмечены звездочками.

Мы усовершенствовали маркер *pheS*_{BsA309G} введением дополнительной мутации T255S, которая соответствует мутации T251S, повышающей эффективность включения 4CP в белке PheS из *E. coli*. Полученный маркер *pheS*_{BsT255S/A309G} придавал чувствительность к 1 мМ 4CP даже при культивировании на богатой среде и, следовательно, обеспечивал возможность отбирать бесплазмидные клоны на агаризованной богатой среде LB, содержащей в десять раз меньше 4CP, чем требуется в случае одиночного мутанта *pheS*_{BsA309G} (1 мМ и 10 мМ, соответственно).

Высев интегрантов со встроенной плазмидой, содержащей маркер *pheS*_{Bst255S/A309G} (первый кроссинговер), на чашки с LB агаром в присутствии 1 мМ 4СР и последующее культивирование в течение 24 часов позволяло получить около 100% клонов, утративших плазмиду (второй кроссинговер) (см. Рис. 1, Б). ПЦР-анализ полученных клонов показывал, что почти половина из них содержала желаемую мутацию на хромосоме. Кроме того, использование контрселекции дополнительно сократило получение хромосомных мутаций на двое суток (Рис. 1).

Таким образом, разработанный в ходе данных исследований метод замещения аллелей рекомбинацией и его модификацию с применением контрселективного маркера можно использовать в качестве рутинного инструмента как для исследования физиологических путей, так и для метаболической инженерии промышленных продуцентов на основе бацилл. Используя этот подход, в ходе данной работы в хромосомы штаммов *B. subtilis*, а также *B. amyloliquefaciens* (включая нетрансформируемые штаммы), были введены многочисленные генетические модификации (делеции и вставки фрагментов ДНК, а также точечные мутации). Этот метод и вектора pNZT1 и pNZTM1 используются и в других лабораториях АО «АГРИ», а также в других институтах в нашей стране и за рубежом, о чем свидетельствуют многочисленные публикации [Lobanov et al., 2011; Hossain et al., 2015; Gao et al., 2016; Graf et al., 2016; Jiang et al., 2016; Liu et al., 2017; Lapashina and Feniouk, 2019; Li et al., 2020; Yang et al., 2021; Sun et al., 2021 и др.].

1.2. Поиск подходов для изменения генетической регуляции метаболизма бацилл с целью усиления биосинтеза и накопления пуриновых производных

Изначально штаммы-продуценты, способные к повышенному накоплению пуриновых нуклеозидов, получали с помощью мутагенеза и селекции на устойчивость к различным аналогам метаболитов, таким как аналоги пуринов, аналоги глутамина и др. Так, штамм-продуцент инозина и гуанозина *B. amyloliquefaciens* AJ1991 был отобран с помощью нескольких этапов мутагенеза, и содержит мутации, обеспечивающие сверхсинтез IMP и GMP *de novo*. Это мутация ауксотрофности по аденину в гене *purA*, а также мутация устойчивости к пуриновому аналогу 8-азагуанину, вызывающая дерепрессию биосинтеза IMP за счет снятия ретроингибирования ключевого фермента биосинтеза пуринов.

Современные штаммы для промышленного производства пуриновых нуклеозидов получают путем комбинации методов традиционной селекции и метаболической инженерии. Применение метаболической инженерии стало возможным, в том числе, благодаря разработке удобного метода для введения генно-инженерных модификаций, описанного в предыдущем разделе.

1.2.1. Снятие негативной регуляции экспрессии генов пуринового оперона

За биосинтез пуриновых соединений *de novo* отвечают гены, объединенные у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* в оперон *purEKBCSQLFMNHD*. Известно, что экспрессия *pur*-оперона подвержена двойной негативной регуляции с участием

промотора (KMBS283 (*Ppur*₁₀ *purR*::*spc trpC2*)), делецию аттенуатора (KMBS286 (Δ att *purR*::*spc trpC2*)) или комбинацию этих двух мутаций (KMBS287 (*Ppur*₁₀ Δ att *purR*::*spc trpC2*)).

В отобранных рекомбинантных штаммах, KMBS292 (*purE*::pMUTIN4 *trpC2*), KMBS295 (*purE*::pMUTIN4 *purR*::*spc trpC2*), KMBS296 (*Ppur*₁₀ *purE*::pMUTIN4 *purR*::*spc trpC2*), KMBS299 (Δ att *purE*::pMUTIN4 *purR*::*spc trpC2*) и KMBS300 (*Ppur*₁₀ Δ att *purE*::pMUTIN4 *purR*::*spc trpC2*), плазмида pMUTIN4-*purE* была интегрирована в хромосому с образованием транскрипционных слияний *Ppur-lacZ*, *Ppur*₁₀-*lacZ*, *Ppur* Δ att-*lacZ* и *Ppur*₁₀ Δ att-*lacZ*, соответственно (Рис. 5).

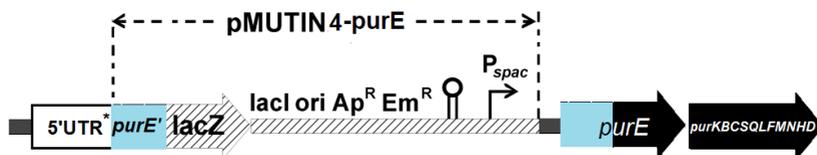


Рис. 5. Схематическое изображение области *purE* у сконструированных штаммов *B. subtilis*, содержащих pMUTIN4-*purE*. 5'UTR*, варианты 5' нетранслируемой области *purE*: дикий тип (*Ppur*), консенсусная последовательность -10 области промотора (*Ppur*₁₀), делеция аттенуатора (Δ att) или комбинация этих двух мутаций (*Ppur*₁₀ Δ att). Голубым цветом показан фрагмент ДНК, по которому проходило встраивание плазмиды в хромосому.

Уровни экспрессии генов пуринового оперона под контролем разных регуляторных элементов оценивали по уровню активности β -галактозидазы (Рис. 6, А). Инактивация гена *purR* повышала уровень экспрессии репортерного гена в 4,5 раза. В штамме *purR*::*spc* мутация *Ppur*₁₀ и мутация Δ att увеличивали экспрессию репортерного гена в 2,8 и 15 раз, соответственно. Объединение этих мутаций имело синергический эффект, повышая уровень экспрессии в 26,5 раза.

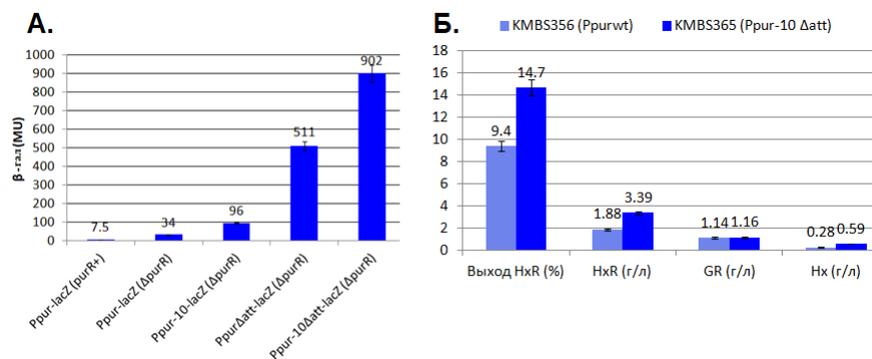


Рис. 6. А. Активность β -галактозидазы в единицах Миллера (β -гал (МУ)), отражающая уровень экспрессии репортерного гена *lacZ* в штаммах *purR*⁺ и Δ *purR*=*purR*::*spc* с модификациями регуляторной области *purE*. Б. Эффект мутаций в регуляторной области пуринового оперона на выход инозина и накопление пуриновых соединений.

Эти данные свидетельствуют о ярко выраженном положительном эффекте исследованных мутаций на уровень транскрипции генов биосинтеза пуринов *de novo*.

Чтобы оценить влияние мутаций на накопление нуклеозидов, мутации *Ppur*₁₀ и *Δatt* были объединены в модельном штамме-продуценте инозина *B. subtilis* KMBS356 (*guaB24 ΔpunA ΔpurA ΔpurR*), который помимо делеции гена репрессора *RurR*, содержал также мутации для предотвращения дальнейших превращений IMP (*ΔpurA*, *guaB24*) и деградации нуклеозидов (*ΔpunA* (или *purG*)). По сравнению с родительским штаммом, полученный штамм KMBS365 (KMBS356 *Ppur*₁₀ *Δatt*), накапливал значительно больше инозина и гипоксантина в культуральной жидкости в процессе ферментации в пробирках (Рис 6, Б). Таким образом, одновременное введение двух мутаций, делеции аттенуаторного участка рибопереключателея и замены двух нуклеотидов для создания консенсусной последовательности в -10 области промотора пуринового оперона, позволило в 1,8 и 1,6 раза повысить накопление и выход целевого продукта инозина, соответственно.

Необходимо отметить, что в продуцентах инозина на основе *B. amyloliquefaciens* снятие репрессии *PurR* было реализовано нами не путем делеции гена *purR*, как в описываемом модельном продуценте инозина, а путем нарушения сайта связывания с репрессором в лидерной области пуринового оперона (*PurRbox1*) (мутация *purE*_{*PurRboxmut*}) (см. рис. 4). Предполагалось, что делеция нуклеотидов, участвующих в образовании терминирующей транскрипцию шпильки, будет иметь более ярко выраженное положительное влияние на штамм-продуцент гуанозина, так как внутриклеточные пулы гуанина, взаимодействующего с G-боксом и запускающего терминацию транскрипции генов G-бокс регулона, в его клетках могут быть повышены благодаря сверхсинтезу GMP. Действительно, введение *Δatt* мутации в промышленный продуцент гуанозина позволило почти на 5% увеличить выход целевого продукта.

1.2.2. Снятие ретронингибирования PRPP-синтетазы

PRPP является ключевым промежуточным продуктом метаболизма, который необходим для синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, кофакторов пиридиновых нуклеотидов NAD^+ и $NADP^+$, а также аминокислот гистидина и триптофана. В процессе синтеза нуклеотидов PRPP участвует как в *de novo*, так и в *salvage* пути. Синтез PRPP из R5P и АТФ катализирует продукт гена *prs*, PRPP-синтетаза (PRS; EC 2.7.6.1). Активность PRPP-синтетаз класса I контролируется с помощью двойного механизма, включающего конкурентное и аллостерическое ингибирование. Конкурентное ингибирование ADP обусловлено его взаимодействием с сайтом связывания для АТФ в активном центре, а аллостерическое ингибирование проявляется в результате взаимодействия с аллостерическим сайтом. В некоторых случаях GDP также является ингибитором, хотя GDP связывается только с аллостерическим сайтом. Активация PRPP-синтетазы неорганическим фосфатом (Pi) и аллостерическое ингибирование ее нуклеотидами ADP и GDP указывает на зависимость биосинтеза PRPP от величины «энергетического заряда» клетки (соотношения АТФ/ADP) и уровня биосинтеза пуриновых нуклеотидов.

PRPP играет двоякую положительную роль в регуляции биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* у *B. subtilis*. С одной стороны, недостаточная концентрация PRPP является лимитирующим фактором для реакции, катализируемой ключевым ферментом этого пути, глутамин-PRPP-амидотрансферазой (продукт гена *purF*). Этот фермент ингибируется пуриновыми нуклеотидами по принципу обратной связи, наиболее эффективным ингибитором является AMP, и увеличение пула PRPP значительно снижает это ингибирование. С другой стороны, PRPP связывает репрессор PurR и таким образом дерепрессирует PurR-регулируемые гены, ответственные за синтез *de novo* пуриновых нуклеотидов.

Таким образом, логично предположить, что устойчивость фермента PRPP-синтетазы к ингибированию конечными продуктами пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов может способствовать усилению метаболического потока, направленного на биосинтез их предшественника PRPP, а значит, по приведенным выше причинам, повысить накопление пуриновых нуклеозидов в соответствующих штаммах-продуцентах *Bacillus*.

Действительно, к моменту начала наших исследований было известно, что сверхэкспрессия устойчивого к ADP фермента PRS из *E. coli* увеличивает накопление инозина соответствующим штаммом-продуцентом *E. coli*. Однако PRPP-синтетазы со снятым ингибированием из штаммов *Bacillus*, а также влияние таких ферментов на продукцию пуриновых нуклеозидов не были известны. Поэтому была поставлена задача – изучить биохимические свойства белка PRS из *B. amyloliquefaciens* и выявить мутации, способные изменить аллостерические регуляторные механизмы этого белка, сделав его нечувствительным к ретроингибированию пуриновыми нуклеотидами.

***In silico* поиск мутаций устойчивости к ингибированию нуклеотидами у PRPP-синтетаз из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*.** В хорошо изученном изоферменте I PRS человека (PRS1) были описаны несколько аминокислотных замен, приводящих к более высокой устойчивости к ингибированию ADP и GDP, а также к активации фермента более низкими концентрациями Pi. Основываясь на высокой консервативности аминокислотной последовательности PRS среди различных организмов и сходстве третичных и четвертичных структур PRS1 и PRS из *B. subtilis* (PRS_{Bs}), мы предположили, что мутации в бациллярных PRS, гомологичные мутациям в PRS1, ответственным за активацию белка Pi и его устойчивость к ретроингибированию, могут играть похожую роль в белках из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*.

Поскольку на момент исследований по данной теме сиквенс гена *prs* из *B. amyloliquefaciens* K не был известен, праймеры для наработки и клонирования фрагмента, содержащего открытую рамку считывания (OPC), кодирующую PRS у *B. amyloliquefaciens* K, подбирали, используя опубликованный сиквенс *B. subtilis* 168 (NC_000964.3). Анализ последовательности полученного ПЦП-продукта показал, что он содержал OPC, гомологичную *prs* из *B. subtilis* (*prs*_{Bs}) (85% идентичных п. н.). Выравнивание аминокислотных последовательностей PRS из *B. subtilis* (PRS_{Bs}), *H. sapiens* (PRS1) и предсказанной последовательности PRS из *B. amyloliquefaciens* (PRS_{Ba}) (Рис. 7) показало, что PRS_{Ba} имеет 96% и 47% идентичных аминокислот с PRS_{Bs} и PRS1, соответственно. Кроме того, аминокислотные остатки

Кинетику ферментативных реакций рекомбинантных белков изучали в зависимости от субстратов R5P и АТФ (Mg-АТФ). При насыщающих концентрациях АТФ кинетические данные для всех протестированных ферментов в отношении R5P хорошо описывались гиперболической кривой. При насыщающих концентрациях R5P и различных концентрациях АТФ кинетические данные описывались сигмоидальной кривой. Кажущиеся значения V_{max} для белков PRS_{BaWT} и PRS_{BaD58H} были практически идентичными (Таблица 2). Белки PRS_{BaN120S} и PRS_{BaL135I} показали значения V_{max} на 19–32% выше, чем у белка PRS_{BaWT}. Кажущиеся значения K_M для АТФ и R5P у PRS_{BaD58H}, PRS_{BaN120S} и PRS_{BaL135I} были на 20 – 88% выше, чем значения для рекомбинантного фермента дикого типа, что указывает на то, что мутантные ферменты имели более низкое сродство к АТФ и R5P (Таблица 2).

Таблица 2. Кинетические параметры рекомбинантных PRS_{Ba}.

| PRS _{Ba} | АТФ | | | R5P | |
|------------------------|-------------|-----------|--------------------------------------------------------|-------------|---------------------------------|
| | K_M (мкМ) | n_H | V_{max} (мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹) | K_M (мкМ) | V_{max} (U мг ⁻¹) |
| PRS _{BaWT} | 50 ± 3 | 1,3 ± 0,1 | 37 ± 1 | 105 ± 7 | 31 ± 1 |
| PRS _{BaD58H} | 83 ± 6 | 2,6 ± 0,4 | 36 ± 1 | 157 ± 21 | 26 ± 2 |
| PRS _{BaN120S} | 60 ± 6 | 1,3 ± 0,2 | 44 ± 2 | 180 ± 14 | 41 ± 1 |
| PRS _{BaL135I} | 94 ± 4 | 1,8 ± 0,1 | 45 ± 1 | 189 ± 12 | 40 ± 1 |

Как и для ферментов PRS класса I из других организмов, оказалось, что для активности PRS из *B. amyloliquefaciens* требуется Pi (Таблица 3). Сравнение значений K_a для PRS_{BaN120S}, PRS_{BaL135I} и PRS_{BaWT}, показали, что половинная активация PRS_{BaN120S} и PRS_{BaL135I} происходила при значительно более низких концентрациях Pi чем у белка дикого типа. Изучение ингибирования ферментов нуклеозиддифосфатами показало, что в соответствии со свойствами PRS I класса PRS_{BaWT} ингибируется ADP и GDP. Мутантные ферменты PRS_{BaN120S} и PRS_{BaL135I} оказались гораздо более устойчивыми к обоим нуклеотидам чем PRS_{BaWT}, тогда как PRS_{BaD58H} показал сходную с PRS_{BaWT} чувствительность к ADP и GDP (Таблица 3). Значения IC₅₀ для ADP и GDP у рекомбинантного белка *B. amyloliquefaciens* дикого типа указывали на то, что этот фермент в 2 раза более чувствителен к ингибированию ADP, чем PRS из близкородственного *B. subtilis*, а также в 4 и 10 раз, соответственно, более устойчив к ADP и GDP по сравнению с изоферментом I PRS человека.

Таблица 3. Удельная активность, значения IC₅₀ и константы активации указанных рекомбинантных белков.

| PRS _{Ba} | A (E мг ⁻¹) | IC ₅₀ (мМ) | | Константы активации Pi | |
|------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------|------------------------|-----------|
| | | ADP | GDP | K_a (мМ) | n_H |
| PRS _{BaWT} | 37 ± 1 | 0,08 ± 0,01 | 0,45 ± 0,03 | 2,7 ± 0,1 | 3,4 ± 0,1 |
| PRS _{BaD58H} | 33 ± 2 | 0,07 ± 0,01 | 0,51 ± 0,04 | 6,7 ± 0,3 | 2,5 ± 0,3 |
| PRS _{BaN120S} | 42 ± 2 | 0,44 ± 0,03 | >1,0 | 0,6 ± 0,1 | 2,3 ± 0,3 |
| PRS _{BaL135I} | 44 ± 2 | 0,84 ± 0,06 | >1,0 | <0,5 | – |

Итак, из трех исследованных мутантных белков наиболее перспективными оказались PRS_{BaN120S} и PRS_{BaL135I}, которые продемонстрировали значительную устойчивость к нуклеотидам ADP и GDP, а также сниженную потребность в неорганическом фосфате для активации. Устойчивость PRS к ингибированию по принципу обратной связи усиливает синтез предшественника пурина, PRPP, что может повысить накопление инозина и гуанозина, которые являются конечными продуктами метаболизма пуринов у штаммов, продуцирующих пуриновые нуклеозиды. Поскольку ферментацию со штаммами бацилл, продуцирующими нуклеозиды, обычно проводят в условиях лимита по P_i, активация фермента при низких концентрациях фосфата также может иметь положительный эффект.

Влияние полученных мутаций в PRPP-синтетазе на рост, потребление глюкозы и продукцию пуриновых нуклеозидов у *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*. Чтобы изучить влияние полученных мутаций на характеристики продуцентов нуклеозидов, мы ввели соответствующие нуклеотидные замены в гены *prs* на хромосомах модельных продуцентов нуклеозидов, *B. amyloliquefaciens* AJ1991 и *B. subtilis* KMBS375, и оценили параметры родительских и мутантных штаммов в процессе ферментации.

Рост клеток, потребление глюкозы и продукция пуриновых нуклеозидов в пробирочной ферментации для AJ1991, а также его производных, штаммов NZBA58, NZBA120 и NZBA135, содержащих мутации в генах *prs*, приводящие к белковым заменам D58H, N120S и L135I, соответственно, показаны на Рис. 8.

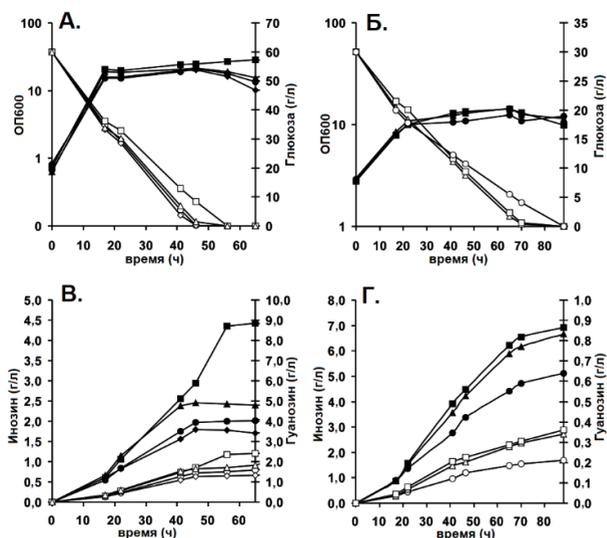


Рис. 8. Влияние различных мутаций PRS на рост, потребление глюкозы и продукцию нуклеозидов у *B. amyloliquefaciens* AJ1991 (А, В) и *B. subtilis* KMBS375 (Б, Г). Штаммы с PRS_{Ba/BsWT}, кружки; PRS_{Ba/BsD58H}, ромбы; PRS_{Ba/BsN120S}, треугольники, PRS_{Ba/BsL135I}, квадраты. Значения ОП600 и концентрации инозина показаны закрашенными символами. Концентрации глюкозы и гуанозина показаны незакрашенными символами. Показаны средние значения трех независимых опытов. Стандартные отклонения: <5% для концентраций и <8% для ОП600.

Мутации N120S и L135I увеличивали скорость продукции и общее накопление инозина и гуанозина (Рис. 8, В), при этом мутация L135I проявляла более выраженный эффект. По сравнению с AJ1991, выходы (г продукта на г потребленной глюкозы) инозина и гуанозина в NZBA120 были выше на 21% и 15%, соответственно, тогда как выходы в NZBA135 увеличились на 118% и 48%,

соответственно (Таблица 4). Кроме того, мутация N120S, и, в большей степени, мутация L135I, вызывали небольшое, но достоверное увеличение накопления биомассы (Рис. 8, А), что может быть связано с более высокой доступностью PRPP для биосинтеза пиримидиновых и пиридиновых нуклеотидов, а также аминокислот гистидина и триптофана. Тем не менее, выходы инозина на г биомассы у NZBA120 и NZBA135 были выше, чем у родительского штамма на 19% и 61%, соответственно. По сравнению со штаммом AJ1991, продуктивности по инозину у NZBA120 и NZBA135 были также выше, на 23% и 81%, соответственно (Таблица 4). Напротив, мутация D58H оказывала негативное влияние на продукцию нуклеозидов. По сравнению с родительским штаммом AJ1991, штамм NZBA58 продемонстрировал снижение выхода инозина и гуанозина на 12% и 19%, соответственно.

Влияние наиболее перспективных мутаций, N120S и L135I, на продукцию нуклеозидов было изучено также на примере *B. subtilis* (Рис. 8 Б, Г). Мутации N120S и L135I в PRS в штамме KMBS375 вызывали небольшое увеличение накопления биомассы и скорости потребления глюкозы. Более того, как и в случае *prs*-мутантов AJ1991, продукция пуриновых нуклеозидов была выше как у мутанта N120S, так и у мутанта L135I. По сравнению со значениями родительского штамма выход инозина на г глюкозы, у NZBS120 и NZBS135 был на 31% и 36% выше, соответственно, а выход инозина на г биомассы, был выше на 12% и 19%, соответственно (Таблица 4). KMBS375 накапливал также небольшое количество гуанозина в культуральной жидкости. По сравнению с выходом KMBS375, выход гуанозина на г глюкозы для штаммов NZBS120 и NZBS135 был выше на 61% и 71%, соответственно.

Таблица 4. Влияние различных мутаций в гене *prs* штаммов-продуцентов нуклеозидов на параметры ферментации (В, выход; П, продуктивность; Г, глюкоза; Ино, инозин; Гуа, гуанозин; Б, биомасса).

| Штамм | PRS* | В (%) г Ино на | | В (%) г Гуа на | | В (%) г Б на г Г | П (г/л/ч) | |
|------------------------------------|-------|----------------|-----|----------------|-----|------------------|-----------|--------|
| | | г Г | г Б | г Г | г Б | | Ино | Гуа |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | | | | | | | | |
| AJ1991 | - | 3,4 | 31 | 2,7 | 25 | 11,0 | 0,043 | 0,031 |
| NZBA58 | D58H | 3,0 | 29 | 2,2 | 21 | 10,3 | 0,039 | 0,027 |
| NZBA120 | N120S | 4,1 | 37 | 3,1 | 27 | 11,1 | 0,053 | 0,036 |
| NZBA135 | L135I | 7,4 | 50 | 4,0 | 27 | 14,8 | 0,078 | 0,042 |
| <i>B. subtilis</i> | | | | | | | | |
| KMBS375 | - | 17,0 | 133 | 0,70 | 5,5 | 12,8 | 0,058 | 0,0024 |
| NZBS120 | N120S | 22,2 | 149 | 1,13 | 7,6 | 14,9 | 0,076 | 0,0039 |
| NZBS135 | L135I | 23,1 | 158 | 1,20 | 8,2 | 14,6 | 0,079 | 0,0041 |

Итак, впервые биохимически охарактеризована PRPP-синтетаза из *B. amyloliquefaciens*, найдены мутации устойчивости к ретроингибированию N120S и L135I, которые могут быть использованы для улучшения промышленных штаммов *Bacillus*, продуцирующих нуклеозиды, а возможно и другие метаболические производные PRPP.

1.2.3. Усиление конверсии пуриновых нуклеотидов в нуклеозиды.

Поиск генов 5'-нуклеотидаз, изучение регуляции их экспрессии и биохимических характеристик продуктов их генов

При конструировании штаммов-продуцентов пуриновых нуклеозидов, аденозина, инозина, гуанозина, а также рибофлавина и АИСаг для биотехнологических производств важно не только усилить метаболический поток в сторону биосинтеза их фосфорилированных предшественников, AMP, IMP, GMP, FMN и АИСАР, соответственно, но и обеспечить в клетке достаточную фосфатазную или 5'-нуклеотидазную активность, чтобы активировать их гидролиз до соответствующего конечного продукта. Поэтому поиск малоизученных у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* генов, кодирующих 5'-нуклеотидазы, являлся важной частью этого исследования.

1.2.3.1. *In silico* поиск генов, кодирующих 5'-нуклеотидазы у бацилл

Идентификация и характеристика гена *yutF*, изучение регуляции его экспрессии. Большинство растворимых внутриклеточных 5'-нуклеотидаз человека, дрожжей и бактерий принадлежат к обширному суперсемейству НАД, которое включает ферменты, использующие аспаргат в активном центре для нуклеофильного катализа реакций переноса углеродной или фосфорильной группы на разнообразный спектр субстратов. Один из охарактеризованных членов этого суперсемейства из *E. coli*, UmpH (NagD), активен в отношении целого ряда фосфорилированных соединений, предпочтительно UMP и GMP и играет важную роль в регуляции пулов пиримидиновых нуклеотидов.

Известно, что продукты ортологичных генов могут обладать сходной функцией в соответствующих организмах. Для поиска ортолога UmpH у *B. subtilis* мы применили двунаправленный поиск гомологов для выявления взаимных лучших совпадений (reciprocal best hits, RBH). С высокой степенью достоверности ($E=9 \times 10^{-43}$) ортологичным геном для *umpH* у *B. subtilis* оказался ген *yutF*. Белки UmpH и YutF являются членами подсемейства ПА суперсемейства НАД. Все члены этого подсемейства содержат высококонсервативный основной (коровый) домен α/β и переменный кэп-домен, который освобождает активный сайт для катализа и придает ферменту субстратную специфичность.

Активный сайт основного домена образован четырьмя петлями, соответствующими мотивам последовательности I-IV (Рис. 9). Кэп-домен С2 расположен между вторым и третьим мотивом (остатки UmpH 71–175) и включает аминокислотные остатки, участвующие в распознавании субстрата, который часто называют петлей субстратной специфичности (остатки UmpH 144–149). На момент исследований на основании наличия консервативных доменов YutF был аннотирован в базе данных NCBI Protein как не охарактеризованная гидролаза или предполагаемая *p*-нитрофенилфосфатаза. Сравнение кристаллических структур UmpH (PDB id: 2c4n) и YutF (PDB id: 3pdw) показало, что оба белка проявляют структурное сходство, идентичность консервативных каталитических остатков основного домена и сходные каталитические остатки в активном центре (Asp9, Asp11, Thr42, Lys176, Asp201 и Asp206 в UmpH соответствуют Asp10, Asp12, Thr43, Lys181, Asp206 и Asp211 в YutF). Это указывает на то, что YutF и UmpH могут быть функциональными гомологами. Однако мотив NPDTHG, формирующий субстрат-

специфическую петлю у UmpH, совпадает у YutF только в двух из шести положений (NGDIAI), что предполагает наличие различий в спектрах субстратов для UmpH и YutF.

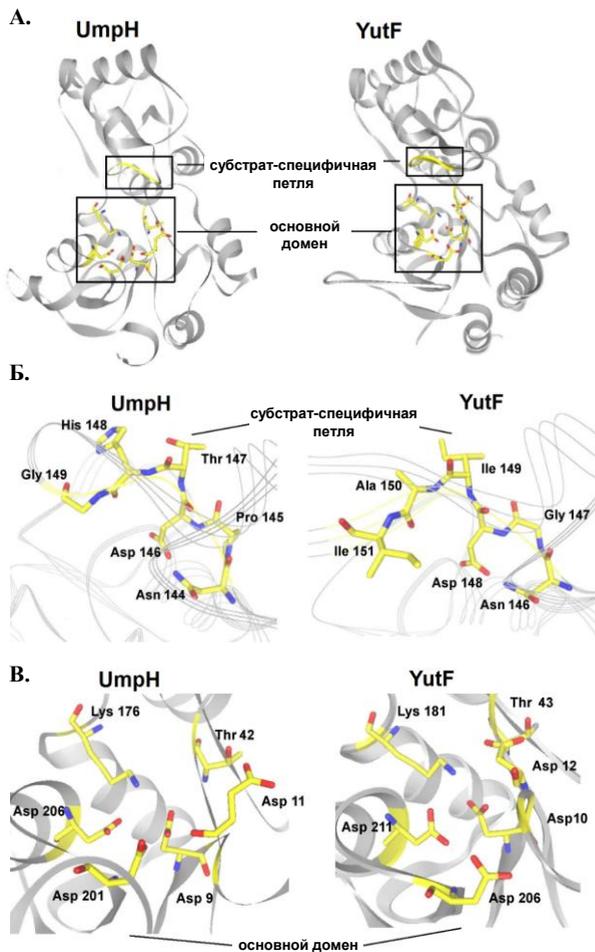


Рис. 9. Сравнение ленточных диаграмм 3D-пространственных структур белков UmpH (PDB id: 2c4n) и YutF (PDB id: 3pdw). **А,** весь белок; **Б,** увеличенное изображение субстрат-специфичной петли; **В,** конфигурация консервативного основного домена. Указаны задействованные в катализе а. о.

Биохимические свойства продукта гена *yutF*. Определение *p*-нитрофенилфосфатазной активности в грубых клеточных экстрактах штаммов с различными уровнями экспрессии гена *yutF* показало, что продукт гена отвечает за основную фосфатазную активность в отношении неприродного субстрата *p*-нитрофенилфосфата в клетках *B. subtilis* (Таблица 5).

Таблица 5. Зависимость *p*-нитрофенилфосфатазной активности клеток *B. subtilis* (A) от уровня экспрессии гена *yutF*.

| Штамм | A, нмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹ |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>B. subtilis</i> 168 | 24,5 ± 2,5 |
| BsΔ <i>yutF</i> | <1 |
| BsΔ <i>yutF</i> (pMWAL1-Prep- <i>yutF</i>) | 542,2 ± 58,0 |

Для исследования биохимических характеристик белка YutF он был наработан в *E. coli* виде рекомбинантного белка Ht-YutF и очищен до гомогенности с помощью ИМАС. Молекулярный вес нативного белка YutF, 65 ± 10 кДа, определенный с помощью гель-фильтрации, указывал на его димерную организацию.

Предварительный скрининг по отношению к неприродным субстратам свидетельствовал об отсутствии у фермента фосфодиэстеразной активности.

Определение оптимальных условий реакции рекомбинантного белка по отношению к хромогенному субстрату *p*NPP (*p*-нитрофенилфосфатазная активность) и по отношению к природным фосфорилированным субстратам (5'-нуклеотидазная активность) выявило зависимость от ионов Mg²⁺ и оптимум pH (для *p*-нитрофенилфосфатазной активности он составил 8,9 (в Tris-HCl), а для 5'-нуклеотидазной активности – 6,0 (в MES)). В оптимальных условиях был проведен скрининг субстратов для Ht-YutF (Таблица 6) и определены кинетические параметры фермента в реакции с наиболее предпочтительными субстратами (Таблица 7).

Таблица 6. Активность рекомбинантного Ht-YutF (A) по отношению к *p*NPP, а также к различным природным субстратам.

| Субстрат | A (мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹) | Субстрат | A (мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹) |
|--------------|------------------------------------------------|----------|------------------------------------------------|
| <i>p</i> NPP | 89 ± 8 | CTP | 0,025 ± 0,003 |
| R5P | 0,69 ± 0,06 | UTP | 0,015 ± 0,002 |
| XMP | 0,51 ± 0,04 | CMP | 0,014 ± 0,002 |
| PRPP | 0,26 ± 0,03 | dAMP | 0,013 ± 0,002 |
| IMP | 0,079 ± 0,007 | ITP | 0,012 ± 0,002 |
| GMP | 0,074 ± 0,007 | GDP | 0,011 ± 0,002 |
| dGMP | 0,071 ± 0,006 | G6P | 0,009 ± 0,001 |
| dIMP | 0,062 ± 0,006 | GTP | 0,006 ± 0,001 |
| UMP | 0,042 ± 0,004 | ADP | 0,004 ± 0,001 |
| AMP | 0,028 ± 0,003 | ATP | 0,004 ± 0,001 |
| IDP | 0,026 ± 0,003 | – | – |

Рекомбинантный белок продемонстрировал относительно высокую фосфогидролазную активность по отношению к R5P, 5'-XMP и PRPP и обладал умеренной активностью по отношению к различным нуклеотидам, гидролизует преимущественно 5'-нуклеозидмонофосфаты.

Таблица 7. Кинетические параметры Ht-YutF по отношению к наиболее предпочтительным субстратам.

| Субстрат | K_M (мМ) | V_{max} (мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹) | k_{cat} (с ⁻¹) | k_{cat}/K_M (с ⁻¹ М ⁻¹) |
|----------|---------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------|
| pNPP | 1,64 ± 0,06 | 126 ± 2 | 61,0 ± 1,0 | 37000 |
| XMP | 1,53 ± 0,11 | 0,65 ± 0,02 | 0,31 ± 0,01 | 210 |
| PRPP | 1,27 ± 0,10 | 0,35 ± 0,01 | 0,17 ± 0,01 | 130 |
| R5P | 24 ± 2 | 3,83 ± 0,24 | 1,84 ± 0,12 | 77 |
| GMP | 6,65 ± 1,26 | 0,13 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 | 9,0 |

Специфическая активность в отношении 6-оксопуриносодержащих рибо- и дезоксирибонуклеозидмонофосфатов (5'-XMP, 5'-IMP, 5'-GMP, dGMP и dIMP) была выше, чем в отношении 6-аминопуриносодержащих AMP и dAMP, а также пиримидина (Таблица 6). Мы не обнаружили заметной активности фермента в отношении рибонуклеозид-3'-монофосфатов, G6P или UDP-глюкозы. Кроме того, в отличие от ортолога UmpH, который гидролизировал рибонуклеозидфосфаты, но не дезоксирибонуклеозидфосфаты, рекомбинантный белок YutF был активен в отношении и тех, и других нуклеозидфосфатов. Ht-YutF демонстрировал довольно низкую субстратную специфичность и каталитическую эффективность для всех тестируемых физиологических субстратов, что согласуется с характеристиками других известных нуклеотидаз, представленных в базе данных BRENDA. Максимальная скорость реакции наблюдалась для хромогенного субстрата pNPP, но сродство Ht-YutF к pNPP было почти таким же, как и к природным субстратам 5'-XMP и PRPP. Интересно отметить, что K_M для R5P превышала диапазон известных физиологических концентраций у бактерий (примерно 0,5 мМ для *B. subtilis*), однако k_{cat} для этого субстрата был в несколько раз выше, чем соответствующий коэффициент для 5'-XMP или PRPP (Таблица 7).

Такие характеристики фермента могут быть востребованы, когда внутриклеточная концентрация субстрата в клетках (или его локальная концентрация в определенных клеточных компартментах) достигает экстремально высоких значений, и необходимо немедленное снижение соответствующих пулов путем дефосфорилирования.

Изучение регуляции экспрессии гена *yutF* в составе оперона *yutDEF*.

Анализ нуклеотидной последовательности *yutF* и прилегающих к гену областей хромосомы *B. subtilis in silico* показал, что ближайший потенциальный промотор (последовательность 5'-TTGATG-N17-TATGAT-3', имеющая сходство с консенсусными последовательностями известных SigA-промоторов) расположен выше двух других генов, *yutD* и *yutE*, находящихся, в свою очередь, выше гена *yutF* (Рис. 10). Кроме того, с помощью программы ARNold Finding Terminators были обнаружены две последовательности предполагаемых Rho-независимых терминаторов транскрипции, первая на 5'-конце кодирующей области *yutF* ($\Delta G = -11,5$ ккал/моль), и вторая — ниже стоп-кодона *yutF* ($\Delta G = -11,5$ ккал/моль). Эти данные согласуются с данными анализа транскриптома для этой области хромосомы у *B. subtilis* и указывают на наличие транскрипционной единицы,

включающей ОРС *yutD*, *yutE* и *yutF*, а также на возможную регуляцию экспрессии *yutF* посредством преждевременной термации транскрипции.

Делеция предположительного промотора (ΔP) или делеция в структурной части гена *yutF* ($\Delta yutF$) в хромосоме *B. subtilis* 168 существенно снижала фосфогидролазную активность по отношению к *pNPP* в неочищенных клеточных экстрактах штаммов Bs ΔP и Bs $\Delta yutF$, соответственно, по сравнению с штаммом *B. subtilis* 168, что подтверждает предположение об определяющей роли промотора P в экспрессии гена *yutF* (Рис. 10).

Для дальнейшего исследования экспрессии *yutF* на основе *B. subtilis* 168 были сконструированы штаммы BsA1, BsA2, BsA3, BsB1, BsB2 и BsB3, содержащие в локусе *amyE* транскрипционные слияния различных фрагментов 5' области гена *yutF* с беспромоторным геном *lacZ* (Рис. 11). Уровень β -галактозидазной активности в полученных штаммах позволял оценивать уровень экспрессии гена *yutF*.

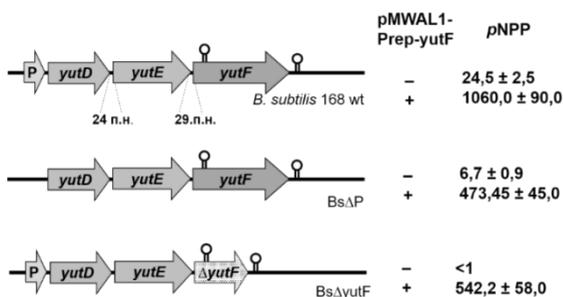


Рис. 10. Схематическое изображение области *yutDEF* хромосомы у штаммов *B. subtilis* 168, Bs ΔP и Bs $\Delta yutF$. Справа указана активность в отношении *pNPP* (нмоль мин⁻¹ мг⁻¹) в грубых клеточных экстрактах соответствующих бесплазмидных штаммов (-) и штаммов с плазмидой pMWAL1-Prep-yutF (+).

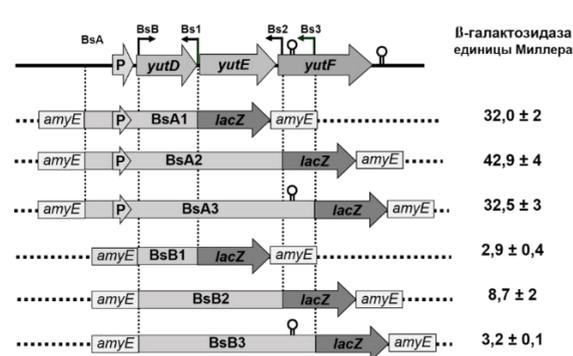


Рис. 11. Схематическое изображение интегрированных в *amyE* локус хромосомы *B. subtilis* 168 транскрипционных слияний различных фрагментов 5' области гена *yutF* с беспромоторным геном *lacZ*. Справа указана активность β -галактозидазы (единицы Миллера). Даны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартные отклонения.

Отсутствие в транскрипционных слияниях области, содержащей предполагаемый промотор P, приводило в штаммах BsB1, BsB2 и BsB3 к значительному снижению β -галактозидазной активности по сравнению с активностью в штаммах BsA1, BsA2 и BsA3, содержащих эту область. Эти данные подтверждают, что *yutD*, *yutE* и *yutF* образуют трицистронный оперон, который транскрибируется с промотора P, расположенного выше гена *yutD*. Необходимо отметить, что у штаммов BsB1, BsB2 и BsB3 наблюдалась некоторая невысокая

активность β -галактозидазы, что коррелирует с остаточным уровнем активности *p*-нитрофенилфосфатазы в Bs Δ P (Рис. 10). Это может свидетельствовать о наличии дополнительного промотора (промоторов) между областью промотора P и кодирующей областью *yutF*, который обеспечивает низкий уровень транскрипции *yutF*, по крайней мере, в условиях данного эксперимента. Транскрипционные слияния с репортерным геном *lacZ* в штаммах BsA2 и BsA3, а также в BsB2 и BsB3 отличаются друг от друга наличием последовательности Rho-независимого терминатора транскрипции, расположенной на N-конце кодирующей последовательности *yutF* (Рис. 11). Штаммы BsA2 и BsB2 обладали более высокой активностью β -галактозидазы, чем BsA3 и BsB3 соответственно, что свидетельствует об участии данной «шпилечной» структуры в преждевременной терминации транскрипции гена *yutF*.

Далее экспрессию *yutF* исследовали в штаммах BsMTN*yutF*, Bs Δ PMTN*yutF* и BsMTN Δ *yutF*, содержащих транскрипционные слияния 5'-концевой области *yutF* с беспромоторным геном-репортером *lacZ*, встроенные непосредственно в локус *yutF* таким образом, что интактная кодирующая область *yutF* экспрессировалась с IPTG-индуцируемого промотора P_{spac} (Рис. 12).

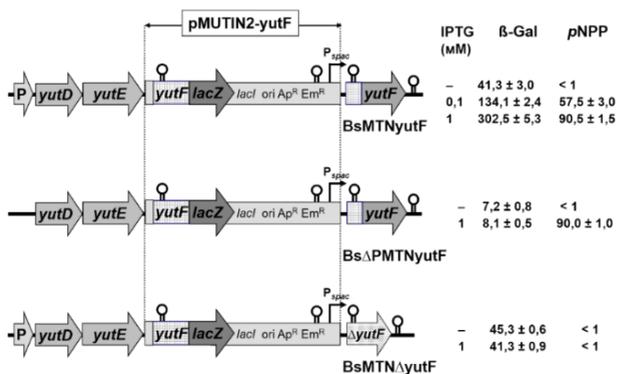


Рис. 12. Схематическое изображение области *yutDEF* хромосомы в штаммах BsMTN*yutF*, Bs Δ PMTN*yutF* и BsMTN Δ *yutF*. Справа приведены активности β -галактозидазы (единицы Миллера) и *p*-нитрофенилфосфатазы (нмоль мин⁻¹ мг⁻¹) в грубых клеточных экстрактах указанных штаммов. Показаны средние значения трех независимых экспериментов \pm стандартные отклонения.

Штамм Bs Δ PMTN*yutF* дополнительно содержал делецию 33 п. н. в последовательности промотора P (от -60 до -28 п. н. по отношению к сайту начала трансляции *yutD*), а штамм BsMTN Δ *yutF* содержал делецию в рамке в структурной части гена *yutF*, нарушавшую функцию гена. Значения β -галактозидазной и *p*-нитрофенилфосфатазной активности в этих штаммах характеризовали уровень экспрессии гена *yutF* и уровень продукции белка YutF, соответственно. У штамма BsMTN*yutF* был обнаружен неожиданный ответ на добавление IPTG: значительное усиление не только активности *p*-нитрофенилфосфатазы, но и активности β -галактозидазы (Рис. 12). Увеличение обеих активностей было прямо пропорционально количеству IPTG в среде. Делеция кодирующей области *yutF*, которая предотвращала продукцию YutF, полностью устраняла IPTG-зависимое

усиление экспрессии репортера *lacZ* в штамме BsMTNΔyutF. Эти данные указывали на положительную регуляцию транскрипции *yutF* белком YutF. Кроме того, значительное снижение активности β-галактозидазы из-за делеции последовательности предполагаемого промотора P в штамме BsΔPMTNyutF подтверждало, что экспрессия *yutF* действительно контролируется этим промотором. Отсутствие индукции β-галактозидазной активности в присутствии IPTG у штамма BsΔPMTNyutF указывало на то, что позитивная регуляция экспрессии *yutF* с помощью YutF контролируется тем же регуляторным элементом P, расположенном выше стартового кодона гена *yutD*.

Дополнительным доказательством положительной авторегуляции экспрессии *yutF* послужили результаты измерения *p*-нитрофенилфосфатазной активности в штаммах *B. subtilis* 168, BsΔP и BsΔyutF, содержащих плазмиду pMWAL1-Prep-yutF, которая обеспечивала сильную конститутивную экспрессию гена *yutF* (см. Рис. 10). Эта активность в штаммах с делецией промотора P или структурной части гена *yutF* в хромосоме (штаммы BsΔP (pMWAL1-Prep-yutF) и BsΔyutF (pMWAL1-Prep-yutF), соответственно) характеризовала уровень экспрессии гена с плазмиды и составляла 500 нмоль мин⁻¹ мг⁻¹. Уровень активности *p*-нитрофенилфосфатазы при экспрессии *yutF* только с хромосомы (штамм *B. subtilis* 168) составлял 24,5 нмоль мин⁻¹ мг⁻¹. Следовательно, уровень *p*-нитрофенилфосфатазной активности в штамме с двойной экспрессией (с хромосомы и плазмиды) должен составлять порядка 525 нмоль мин⁻¹ мг⁻¹. Однако в штамме *B. subtilis* 168 (pMWAL1-Prep-yutF), где *yutF* экспрессировался и с хромосомы, и с плазмиды, *p*-нитрофенилфосфатазная активность была почти в два раза выше ожидаемой (1060 нмоль мин⁻¹ мг⁻¹ и 525 нмоль мин⁻¹ мг⁻¹, соответственно), что является результатом положительной регуляции экспрессии *yutF* собственным продуктом.

Поскольку белок YutF не содержит ДНК-связывающих мотивов, положительная регуляция экспрессии оперона *yutDEF*, очевидно, осуществляется опосредованно. Можно предположить, что при значительном увеличении внутриклеточного пула определенного фосфорилированного соединения, субстрата YutF, белок взаимодействует с этим фосфодонором с образованием промежуточной фосфорилированной формы, способной активировать факторы, положительно влияющие на экспрессию оперона *yutDEF*. Эта гипотеза косвенно подтверждается тем, что фосфатазы суперсемейства НАД имеют очень похожий активный центр и катализируют те же реакции, что двухкомпонентные системы передачи сигнала, позволяющие организмам распознавать и реагировать на изменения в различных условиях окружающей среды, а также недавними исследованиями, которые показали способность некоторых членов суперсемейства НАД претерпевать конформационные изменения в процессе катализа. С целью дальнейшего изучения физиологической роли фермента была изучена регуляция экспрессии его гена в условиях избытка и недостатка фосфатов в среде.

Зависимость экспрессии *yutF* от присутствия фосфатов в среде. Известно, что при недостатке фосфатов в среде культивирования индуцируются гены, продукты которых высвобождают фосфат, необходимый для выживания в условиях фосфатного голодания, однако экспрессия гена *yutF* зависит от присутствия фосфатов в среде другим образом. Уровень экспрессии оценивали по величине

активности β -галактозидазы в клетках штамма BsMTNyutF, который содержит транскрипционное слияние регуляторной области оперона *yutDEF* с репортерным геном *lacZ* и ген *yutF* под контролем IPTG-индуцибельного промотора. Специфические активности β -галактозидазы в клетках, растущих в условиях избытка и недостатка фосфатов, были почти одинаковыми и относительно низкими в отсутствии продукции YutF (условия без добавления IPTG) (Рис. 13). В присутствии IPTG (условия для продукции YutF) специфическая активность β -галактозидазы в клетках BsMTNyutF существенно возрастала, но при этом в клетках, растущих в условиях недостатка фосфатов, она была ниже, чем активность, наблюдаемая в присутствии избытка неорганического фосфата. Эти данные позволяют предположить, что положительное влияние YutF на экспрессию *yutDEF* усиливается в условиях избытка фосфата и согласуются с возможной функцией белка YutF – поддержание физиологически безопасных пулов фосфорилированных субстратов в условиях их неконтролируемого повышения.

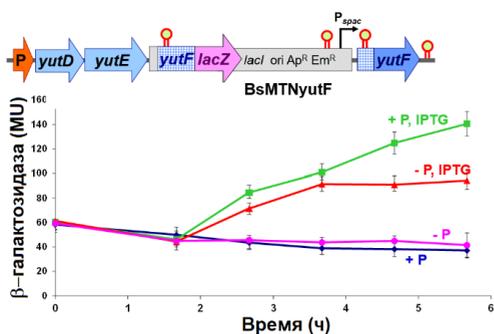


Рис. 13. Влияние P_i и IPTG на активность β -галактозидазы в штамме BsMTNyutF при росте на минимальной среде (МС) без фосфатов (-P); в присутствии 1 мМ KH_2PO_4 , (+P); в присутствии 1 мМ IPTG, (-P, IPTG); в присутствии 1 мМ KH_2PO_4 и 1 мМ IPTG (+P, IPTG).

Гены, гомологичные *yutF*, встречаются у различных бактерий, где они часто ассоциированы с гомологами *yutD* и *yutE* и предположительно также составляют оперон. Однако функции продуктов генов *yutD* и *yutE* неизвестны и поэтому не могут помочь в понимании физиологической роли YutF в клетке. Мы обнаружили способность YutF дефосфорилировать широкий спектр важных клеточных метаболитов, что указывает на его участие в поддержании физиологических концентраций этих соединений в клетке. Однако нельзя исключить существование и других, пока еще не выявленных субстратов для этой фосфатазы.

1.2.3.2. Прямая фенотипическая селекция генов 5'-нуклеотидаз по устойчивости к пуриновым нуклеозидам, идентификация гена *yueE* и *yitU*, биохимическая характеристика рекомбинантных белков YueE и YitU

Второй подход для поиска генов 5'-нуклеотидаз, предложенный в ходе этой работы, основывался на получении библиотеки генов и последующем прямом отборе генов в реципиентном штамме с помощью селекции по фенотипу устойчивости к ингибированию пуриновыми нуклеозидами. С этой целью был сконструирован штамм *E. coli* GS72 (TG1 $\Delta deoD$ *gsk-3*), который содержал делецию в гене *deoD*, кодирующем пуриннонуклеозидфосфорилазу, и мутацию устойчивости к ингибированию конечным продуктом в гене гуанозинкиназы (*gsk-3*). В результате

этих мутаций в штамме была нарушена деградация пуриновых нуклеозидов и одновременно усилена их конверсия в нуклеотиды. При добавлении в среду культивирования гуанозина, инозина или аденозина в клетках штамма GS72 накапливается высокий пул адениловых и гуаниловых нуклеотидов, который подавляет активность PRPP-синтетазы, вызывая, таким образом, голодание по синтезируемым из PRPP метаболитам и остановку роста клеток. Мы предположили, что рост клеток GS72 в присутствии экзогенно добавленных пуриновых нуклеозидов будет возможен при амплификации генов 5'-нуклеотидаз, обеспечивающих дефосфорилирование пуриновых нуклеотидов, снижающее их внутриклеточный пул, и использовали этот подход для отбора таких генов в геномных библиотеках *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, полученных методом «shotgun» на основе малокопийного вектора pMW118. Селекцию клонов GS72, содержащих плазмиды со вставками, осуществляли на минимальной среде с ингибирующими концентрациями гуанозина (50 мкг/мл) и инозина (1500 мкг/мл). В результате эксперимента получили более 50 плазмид, содержащих вставки ДНК размером от 1600 до 6000 п. н. Эти фрагменты были просеквенированы и идентифицированы по гомологии с известными последовательностями базы данных NCBI. Для дальнейшего исследования были отобраны две плазмиды, pMW118-34 и pMW118-26, которые имели в составе клонированных фрагментов гены предположительных фосфогидролаз и сообщали клеткам GS72 наиболее значимый уровень устойчивости к пуриновым нуклеозидам.

Идентификация гена *yueE*, начальная биохимическая характеристика его продукта. Минимизация вставки в составе плазмиды pMW118-34 показала, что за фенотип устойчивости к пуриновым нуклеозидам отвечает ген *B. subtilis yueE*, кодирующий предположительную металл-зависимую фосфогидролазу, принадлежащую к суперсемейству фосфогидролаз, содержащих домен HD (HD domain phosphohydrolase). Поиск возможных субстратов для YueE с помощью энзиматического скрининга выявил фосфодиэстеразную активность фермента и активацию ионами Mn^{2+} . Очищенный рекомбинантный белок Ht-YueE показал наличие активности в отношении как хромогенного субстрата bis-*p*NPP, так и природного циклического нуклеотида 2',3'-сАМР, что подтвердило наличие у белка фосфодиэстеразной активности. Количественное определение возможных продуктов реакции с 2',3'-сАМР выявило, что фермент образует при гидролизе исключительно 3'-АМР, гидролизуя 2'-связь с кинетическими константами, представленными в Таблице 8. Поиск гомологов YueE с помощью программы BLAST показал, что он присутствует в целом ряде бактерий, однако среди этих белков нет ни одного с известной функцией. Известно, что циклические нуклеотиды, в том числе и 2',3'-сАМР, играют важную регуляторную роль в клетках. Можно предположить, что ген *yueE*, продукт которого участвует в гидролизе циклических нуклеотидов, может быть вовлечен в регуляторные процессы клетки.

Таблица 8. Кинетические параметры Ht-YueE

| Субстрат | Активность, мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹ | K_M (мМ) | V_{max} (Е мг ⁻¹) | k_{cat} (с ⁻¹) | k_{cat}/K_M (с ⁻¹ М ⁻¹) |
|------------|----------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 2',3'-cAMP | 33 ± 4 | 20,34 ± 1,26 | 154 ± 5 | 0,05 | 2,53 |

Однако для более полного понимания физиологической роли гена *yueE* и его продукта в клеточном метаболизме требуется их дальнейшее изучение, которое не входило в задачи данной работы. Дальнейший поиск генов 5'-нуклеотидаз, специфичных к пуриновым нуклеотидам, продолжили изучением второй плазмиды (pMW118-26), отобранной в штамме GS72 при селекции по фенотипу устойчивости к пуриновым нуклеозидам.

Идентификация гена *yitU*, биохимическая характеристика его продукта.

Минимизация вставки в составе плазмиды pMW118-26 показала, что за фенотип устойчивости к пуриновым нуклеозидам отвечает ген *yitU* из *B. amyloliquefaciens*. *In silico* анализ ОРС *yitU* из *B. subtilis* (*yitU*_{Bs}) и *B. amyloliquefaciens* (*yitU*_{Ba}) обнаружил высокое сходство их нуклеотидных последовательностей (75,2%). Согласно опубликованному транскриптому *B. subtilis*, *yitU*_{Bs} транскрибируется с промотора SigA как часть трицистронного транскрипта, который также включает лежащие за ним гены BSU_11136 и *yizC*, функции которых также неизвестны. Из-за наличия специфических доменов и сходства с гидролазой Cof *E. coli* продукт гена *yitU* был аннотирован в базе данных белков NCBI как предполагаемая фосфатаза и отнесен к подсемейству NAD-PIB Cof-типа суперсемейства NAD. Транслированные белки из *B. subtilis* (YitU_{Bs}) и *B. amyloliquefaciens* (YitU_{Ba}) имеют 78,9% идентичных и 87,0% сходных аминокислотных остатков, что предполагает идентичную функцию этих белков в клетках обоих видов бактерий.

Для изучения биохимических свойств и субстратного спектра YitU_{Bs} он был наработан и очищен в виде рекомбинантного белка Ht-YitU_{Bs}. Скрининг природных фосфорилированных субстратов (дезоксирибо- и рибонуклеозид три-, ди- и монофосфаты, фосфаты сахаров и т.д.) для Ht-YitU_{Bs} выявил наибольшую активность в отношении дезоксирибо- и рибонуклеозидмонофосфатов (Таблица 9). Для наиболее предпочтительных субстратов FMN, dAMP, GMP, dGMP, CMP, AMP, XMP, IMP и AICAR были изучены кинетические параметры фермента (Таблица 10).

Для AICAR реакция характеризовалась положительной кооперативностью с коэффициентом Хилла 1,83 ± 0,15. Кинетическое поведение фермента при гидролизе всех остальных тестируемых субстратов описывалось кинетикой Михаэлиса-Ментен. Значения K_M по отношению ко всем протестированным субстратам, за исключением FMN, лежали в диапазоне миллимолярных концентраций, что говорило о низкой субстратной специфичности и умеренной каталитической эффективности Ht-YitU_{Bs}. Однако для FMN константа Михаэлиса была почти на три порядка ниже, а каталитическая эффективность на два порядка выше, чем в случае других протестированных субстратов. Одновременно с нашими исследованиями биохимических свойств YitU *Sarge et al.* [2015] обнаружили, что продукты генов *ucsE*, *uwfE* и *yitU* из *B. subtilis* с высокой каталитической эффективностью осуществляют дефосфорилирование промежуточного соединения в пути биосинтеза рибофлавина, AgPP (см. Рис. 14), с образованием

пиримидинового предшественника рибофлавина. Авторы также показали относительно высокую специфическую активность белков YcsE, YwtE и YitU в отношении FMN.

Мы обнаружили, что, хотя, константы Михаэлиса для GrPP и FMN у YitU были примерно одинаковыми, каталитическая константа (k_{cat}) и каталитическая эффективность фермента (k_{cat}/K_M) в отношении FMN были значительно выше, чем для GrPP (Таблица 10), что говорит о том, что предпочтительным субстратом для YitU является именно FMN.

Наличие нескольких ферментов (YcsE, YwtE и YitU), активных в отношении GrPP и FMN, но обладающих разным сродством к каждому из этих субстратов у *B. subtilis*, может быть необходимо для тонкой настройки клеточных пулов важных флавинов, рибофлавина, FMN и FAD.

Таблица 9. Специфическая активность (A) рекомбинантного Ht-YitU_{BS} по отношению к различным субстратам.

| Субстрат | A (мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹) | Субстрат | A (мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹) |
|----------------------|------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------|
| FMN (0,1 мМ) | 24,8 ± 3,6 | TDP | 0,52 ± 0,07 |
| | 17 ± 2* | | |
| GrPP (0,3 мМ) | 1,7 ± 0,4* | Маннозо-6-фосфат | 0,52 ± 0,07 |
| dAMP | 13,1 ± 1,9 | 3'-AMP | 0,37 ± 0,06 |
| GMP | 12,1 ± 1,7 | Глюкозо-6-фосфат | 0,33 ± 0,05 |
| СМР | 10,9 ± 1,5 | ADP | 0,32 ± 0,05 |
| AMP | 9,7 ± 1,4 | Фруктозо-6-фосфат | 0,29 ± 0,04 |
| dGMP | 9,5 ± 1,6 | ГТР | 0,21 ± 0,04 |
| XMP | 8,4 ± 1,4 | Эритрозо-4-фосфат | 0,19 ± 0,03 |
| IMP | 6,4 ± 0,9 | СТР | 0,16 ± 0,03 |
| AICAR | 2,8 ± 0,6 | ГТР | 0,14 ± 0,02 |
| 2'-AMP | 2,2 ± 0,4 | Фосфорибозил-пирофосфат | 0,13 ± 0,02 |
| CDP | 1,4 ± 0,4 | UDP | 0,13 ± 0,02 |
| UMP | 1,3 ± 0,3 | АТР | 0,12 ± 0,02 |
| GDP | 1,3 ± 0,4 | FAD | <0,1 |
| 6-фосфо-глюконат | 1,2 ± 0,3 | УТР | <0,1 |
| IDP | 0,90 ± 0,19 | Фосфоенол-пируват | <0,1 |
| Пиридоксаль-5-фосфат | 0,78 ± 0,12 | Глюкозо-1-фосфат | <0,01 |
| NADP ⁺ | 0,75 ± 0,11 | Фосфорноуксусная кислота | <0,01 |
| Рибозо-5-фосфат | 0,54 ± 0,08 | - | - |

* Данные приведены по [Sarge *et al.*, 2015, doi: 10.1002/cbic.201500352]

Таблица 10. Кинетические параметры Ht-YitU_{Bs} по отношению к наиболее предпочтительным субстратам.

| Субстрат | K_M (мМ) | V_{max} (мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹) | k_{cat} (с ⁻¹) | k_{cat}/K_M (с ⁻¹ М ⁻¹) |
|----------|---------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------|
| FMN | 0,096 ± 0,015 | 43,18 ± 1,52 | 22,97 | 2,39 10 ⁵ |
| ArPP* | 0,081 ± 0,006 | – | 0,88 | 1,09 10 ⁴ |
| dAMP | 8,24 ± 0,42 | 49,35 ± 1,10 | 26,25 | 3,19 10 ³ |
| GMP | 7,00 ± 0,29 | 39,97 ± 0,69 | 21,26 | 3,04 10 ³ |
| dGMP | 5,61 ± 0,79 | 25,95 ± 1,33 | 13,80 | 2,46 10 ³ |
| СМР | 17,45 ± 1,82 | 73,65 ± 3,94 | 39,18 | 2,25 10 ³ |
| AMP | 14,32 ± 1,01 | 52,94 ± 2,13 | 28,16 | 1,97 10 ³ |
| XMP | 21,74 ± 2,93 | 70,47 ± 6,56 | 37,49 | 1,72 10 ³ |
| IMP | 17,81 ± 3,15 | 49,51 ± 4,53 | 26,34 | 1,48 10 ³ |
| AICAR | 10,19 ± 1,50 | 21,20 ± 4,12 | 11,28 | 1,11 10 ³ |

* Данные для ArPP приведены по [Sarge *et al.*, 2015].

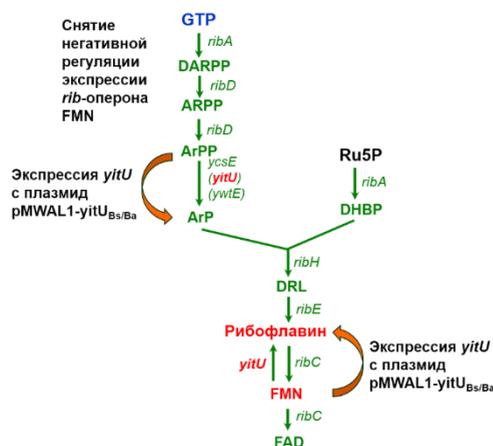


Рис. 14. Схематическое представление пути биосинтеза рибофлавина и эффекта сверхэкспрессии *yitU*. Соединения: **DARPP**, 2,5-диамино-6-рибозиламино-4 (3Н) -пиримидиндион фосфат; **ARPP**, 5-амино-6-(рибозиламино)-2,4-(1Н, 3Н)-пиримидиндион-5'-фосфат; **ArPP**, 5-амино-6-рибителиамино-2,4-(1Н, 3Н)-пиримидиндион-5'-фосфат; **ArP**, 5-амино-6-рибителиамино-2,4-(1Н, 3Н) -пиримидиндион; **DHBP**, 3,4-дигидрокси-2-бутанон 4-фосфат; **DRL**, 6,7-диметил-8-рибитил-люмазин.

FMN контролирует биосинтез и транспорт рибофлавина, регулируя соответствующие гены на уровне транскрипции или трансляции через механизм рибопереключателя. Фосфатазы с различной специфичностью к флавиам, YcsE, YwtE и YitU, скорее всего, проявляют свои регуляторные эффекты в сочетании с другим ферментом, участвующим в превращении рибофлавина в FMN и FMN в FAD, бифункциональной рибофлавин-киназой (EC 2.7.1.26) / FAD-синтазой (EC 2.7.7.2), кодируемой в *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* геном *ribC*.

Промежуточный продукт пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов, AICAR, является природным аналогом AMP и очень важным регуляторным соединением у бактерий, дрожжей и человека. Прямо или опосредованно AICAR влияет на биосинтез пуринов, тиамина и гистидина, а также на одноуглеродный, углеводный и липидный метаболизм. Как было отмечено выше, кинетика гидролиза AICAR демонстрировала сигмоидальное поведение с коэффициентом Хилла 1,83 ± 0,15, что указывает на аллостерическую регуляцию фермента и положительную кооперативность. Значение K_M для AICAR в качестве субстрата находится в диапазоне миллимолярных концентраций, что значительно превышает

физиологические концентрации AICAR (от 1,6 до 21,8 мкМ в экспоненциально выращенных дрожжевых клетках). Следовательно, YitU может гидролизовать AICAR в условиях чрезмерного синтеза этого метаболита. Более того, положительная кооперативность фермента при гидролизе AICAR может быть инструментом адаптации к условиям, в которых пул AICAR резко вырос. Наши эксперименты по изучению эффекта сверхэкспрессии *yitU* в штамме с повышенным пулом AICAR, которые будут изложены далее, согласуются с этим предположением.

В целом, внутриклеточные нуклеотидазы / фосфатазы суперсемейства NAD проявляют более низкую каталитическую эффективность, чем связанные с мембраной, закрепленные на клеточной стенке или внеклеточные нуклеотидазы, одной из основных функций которых является усвоение нуклеотидов из окружающей среды. Низкое сродство к субстратам и относительно низкая каталитическая эффективность внутриклеточных нуклеотидаз отражает их физиологическую функцию и очевидно необходимы для предотвращения истощения пула нуклеотидов в клетке. Другой важной особенностью этих ферментов является то, что, в отличие от классической модели «один фермент для одного субстрата», они реализуют модель «один субстрат для нескольких ферментов».

1.2.3.3. Практическое применение 5'-нуклеотидаз для улучшения свойств штаммов-продуцентов

Сверхэкспрессия *yitU* увеличивает внеклеточное накопление рибофлавина у штамма *B. subtilis* дикого типа. Было обнаружено, что экспрессия *yitU* с плазмид $pMWAL1-yitU_{Bs}$, $pMWAL1-yitU_{Ba}$, $pMWAL1-PyitUBa-yitU_{Bs}$ при культивировании клеток штаммов *B. subtilis* BsC^+ и $Bs\Delta yutF$ придавала культуральной жидкости желто-зеленую окраску (Рис. 15), интенсивность которой увеличивалась с ростом экспрессии гена *yitU* с плазмиды (об экспрессии судили по уровню 5'-нуклеотидазной активности продукта гена (Рис. 15, Б)).

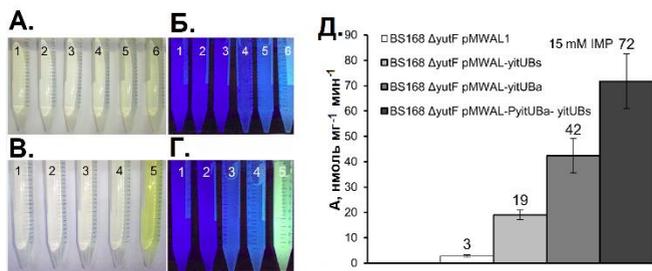


Рис. 15. Влияние повышенной экспрессии гена *yitU* в штаммах *B. subtilis* BsC^+ и $Bs\Delta yutF$ на появление окрашивания культуральной жидкости в процессе культивирования (А, Б, В, Г). Б, Г – изображение получено в УФ лучах. А, Б – 1. BsC^+ , 2.

$BsC^+\Delta U$, 3. BsC^+ ($pMWAL1$), 4. BsC^+ ($pMWAL1-yitU_{Bs}$), 5. BsC^+ ($pMWAL1-yitU_{Ba}$), 6. BsC^+ ($pMWAL1-PyitUBa-yitU_{Bs}$). В, Г – 1. $Bs\Delta yutF$, 2. $Bs\Delta yutF$ ($pMWAL1$), 3. $Bs\Delta yutF$ ($pMWAL1-yitU_{Bs}$), 4. $Bs\Delta yutF$ ($pMWAL1-yitU_{Ba}$), 5. $Bs\Delta yutF$ ($pMWAL1-PyitUBa-yitU_{Bs}$). Д – зависимость активности 5'-нуклеотидазы от уровня плазмидной экспрессии генов *yitU*.

Так как FMN является предпочтительным субстратом для YitU, мы предположили, что окраску среде придает накапливающийся в культуральной

жидкости продукт его дефосфорилирования рибофлавин. Действительно, культуральная жидкость с окрашенным продуктом флуоресцировала в УФ-свете (Рис. 15 Б, Г), что характерно для растворов рибофлавина.

Дальнейший LC-MS/MS анализ бесклеточных культуральных жидкостей, полученных после культивирования штаммов BsC^+ , несущих вектор pMWAL1 или плазмиду pMWAL1-PyitU_{Ba}-yitU_{Bs}, показал, что накопление рибофлавина в штамме с плазмидной экспрессией *yitU* было в 20 раз выше, чем в контрольном штамме с вектором без вставки (2 мг/л против 0,1 мг/л, соответственно).

Сверхэкспрессия *yitU* увеличивает внеклеточное накопление рибофлавина у штамма-продуцента. В качестве модельного продуцента для изучения эффекта аллельного состояния *yitU* на продукцию рибофлавина был выбран штамм *B. subtilis* Y25. Этот штамм был получен путем традиционной селекции клонов, устойчивых к аналогу пурина 8-азагуанину и аналогу рибофлавина розеофлавинолу [Mironov *et al.*, 2002] и способен продуцировать рибофлавин в результате повышенной экспрессии генов биосинтеза пуринов *de novo*, сверхэкспрессии генов *rib*-оперона и дефицита активности рибофлавинкиназы RibC. Как видно из Рис. 16, инактивация *yitU* в штамме Y25 снижала как накопление рибофлавина, так и скорость потребления глюкозы в продуктивной фазе. Незначительное увеличение накопления биомассы (Рис. 16 А), очевидно, связано со снижением превращения FMN в рибофлавин, что делает FMN и FAD более доступными для различных флавопротеинов, катализирующих важные окислительно-восстановительные реакции.

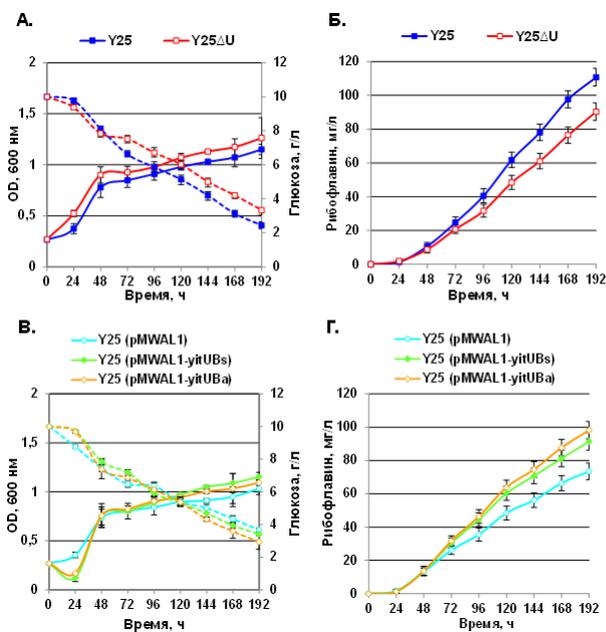


Рис. 16. Влияние уровня экспрессии гена *yitU* на продукцию рибофлавина в штамме-продуценте Y25. Показан эффект делеции (А, Б) и сверхэкспрессии (В, Г) гена на рост клеток, потребление глюкозы (пунктирные линии) (А, В) и накопление рибофлавина (Б, Г).

Напротив, плазмидная экспрессия *yitU* из *B. subtilis* (pMWAL1-*yitU*_{Bs}) и *B. amyloliquefaciens* (pMWAL1-*yitU*_{Ba}) повышала накопление рибофлавина и немного увеличивала потребление глюкозы (Рис. 16 В, Г).

Традиционно считалось, что дефосфорилирование AgPP не является узким местом в продукции рибофлавина даже у промышленных продуцентов, у которых сильно повышена экспрессия других генов биосинтеза рибофлавина. Однако в нашем исследовании мы показали, что повышенная активность 5'-нуклеотидазы *YitU* в *B. subtilis* не только дополнительно повышает продукцию рибофлавина в штамме-продуценте Y25, но также значительно увеличивает накопление рибофлавина в штамме дикого типа, по сути, делая его продуцентом рибофлавина в результате единственной генетической модификации. Положительный эффект сверхэкспрессии *yitU* на продукцию рибофлавина можно объяснить совместным действием нескольких факторов: усилением синтеза FMN (рибофлавина) *de novo* за счет активации одной из его стадий (дефосфорилирование AgPP), усилением конверсии FMN в рибофлавин и снижением пула FMN, что, в свою очередь, приводит к усилению транскрипции генов *rib*-оперона и активации его биосинтеза (см. Рис. 14).

Положительный эффект сверхэкспрессии *yitU* на продукцию пуриновых нуклеозидов и АИСаг. Изучение влияния уровня экспрессии гена *yitU* на продукцию пуриновых нуклеозидов и АИСаг проводили в модельных продуцентах AJ1991 и AJ1991purH::spc, соответственно. Как следует из Таблицы 11, делеция гена *yitU* приводила к почти полному блокированию накопления пуриновых нуклеозидов, инозина и гуанозина, у штамма AJ1991. Напротив, сверхэкспрессия гена *yitU* усиливала продукцию пуринов: штамм AJ1991 (pMWAL1-*yitU*_{Ba}) накапливал значительно больше инозина, ксантозина и на два порядка больше АИСаг по сравнению со штаммом AJ1991 (pMWAL1), содержащим вектор без вставки.

Таблица 11. Влияние уровня экспрессии гена *yitU* на накопление инозина, гуанозина и АИСаг в штамме-продуценте AJ1991.

| Штамм | Инозин, г/л | Гуанозин, г/л | АИСаг, г/л | Ксантозин, г/л |
|--------------------------------------------|-------------|---------------|-------------|----------------|
| AJ1991 | 3,25 ± 0,39 | 1,35 ± 0,39 | ≤ 0,01 | - |
| AJ1991 Δ <i>yitU</i> | 0,22 ± 0,01 | 0,19 ± 0,00 | ≤ 0,01 | - |
| AJ1991(pMWAL1) | 2,58 ± 0,22 | 2,13 ± 0,23 | ≤ 0,01 | 0,042±0,01 |
| AJ1991(pMWAL1- <i>yitU</i> _{Ba}) | 3,49 ± 0,11 | 1,90 ± 0,06 | 1,90 ± 0,17 | 0,12±0,01 |

Основываясь на этих данных, а также на особенном поведении рекомбинантного белка Ht-YitU_{Bs} при гидролизе АИСаг, было изучено влияние делеции и сверхэкспрессии *yitU* из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* на накопление АИСаг штаммом-продуцентом, AJ1991purH::spc (Таблица 12). Делеция *yitU* у AJ1991purH::spc резко снижала продукцию АИСаг, тогда как сверхэкспрессия с плазмид восстанавливала накопление АИСаг в штамме AJΔU, которое было утрачено из-за инактивации гена *yitU* на хромосоме. Более того, по сравнению с

контрольным штаммом AJ1991purH::spc (pMWAL1), штаммы с плазмидной экспрессией *yitU* продемонстрировали 1,6-кратное увеличение накопления AICAr.

Таблица 12. Накопление биомассы и AICAr в конце пробирочной ферментации (72 часа) штаммами AJ1991purH::spc и его производными.

| Штамм | OD ₆₀₀ | AICAr, г/л |
|----------------------------------------------|-------------------|--------------|
| AJ1991purH::spc | 22,85 | 2,88 ± 0,064 |
| AJΔU | 22,04 | <0,01 |
| AJ1991purH::spc (pMWAL1) | 22,87 | 2,74 ± 0,08 |
| AJ1991purH::spc (pMWAL1-yitU _{Bs}) | 18,33 | 4,10 ± 0,03 |
| AJ1991purH::spc (pMWAL1-yitU _{Ba}) | 18,60 | 4,24 ± 0,23 |
| AJΔU (pMWAL1-yitU _{Bs}) | 19,65 | 3,72 ± 0,07 |
| AJΔU (pMWAL1-yitU _{Ba}) | 18,63 | 3,53 ± 0,20 |

Таким образом, с использованием двух независимых подходов, один из которых был впервые предложен в данной работе, у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* были найдены и идентифицированы гены 5'-нуклеотидаз *yutF* и *yitU*, а также ген фосфогидролазы циклических нуклеотидов *yueE*. Показано, что ген *yutF* экспрессируется в составе трицистронного оперона *yutDEF*, и белок YutF усиливает экспрессию гена *yutF*. Наиболее предпочтительными субстратами для рекомбинантного белка YutF являются R5P, 5'-XMP и PRPP, а YitU осуществляет гидролиз ArPP [Sarge *et al.*, 2015] и FMN, участвуя, таким образом, в биосинтезе рибофлавина в *de novo* и *salvage* путях. Благодаря своей способности гидролизовать важные фосфорилированные соединения, такие как нуклеотиды, их предшественники и производные (например, AICAR — аналог AMP с множественными регуляторными функциями, или редокс-активный кофактор FMN), а также циклические нуклеотиды (2',3'-сAMP), найденные гены и их продукты принимают участие в регуляции пулов этих метаболитов, а значит, вносят существенный вклад в регуляцию всего клеточного метаболизма. Также впервые было продемонстрировано, что сверхэкспрессию *yitU* можно успешно применять для рационального конструирования высокоэффективных штаммов, продуцирующих пуриновые нуклеозиды, AICAr и рибофлавин.

1.2.4. Усиление экскреции целевого продукта как важный фактор рационального дизайна продуцентов пуриновых нуклеозидов на основе *E. coli* и штаммов *Bacillus*

При конструировании эффективных продуцентов различных метаболитов необходимо не только обеспечить эффективную работу всех важных этапов биосинтеза целевых продуктов, как это было показано в предыдущих разделах на примере снятия негативной регуляции транскрипции пуринового оперона и получения устойчивых к ретроингибированию мутантных PRPP-синтетаз, а также сверхэкспрессии генов 5'-нуклеотидаз, но и не допустить слишком высокие пулы целевого соединения внутри клетки, которые неизбежно возрастают в полученных «разрегулируемых» мутантах. Слишком высокие концентрации метаболитов могут не только активировать системы деградации целевого продукта, но и

оказывать токсический эффект на весь клеточный метаболизм. Так, например, сверхвысокие концентрации метаболита могут запускать биохимические реакции, не характерные в условиях его физиологических концентраций из-за высоких значений K_M для данного субстрата, а также включать глобальный клеточный ответ на этот стрессовый фактор, что приводит к общей перестройке клеточного метаболизма, замедлению роста, нарушению биосинтеза других клеточных метаболитов и т.д. Все эти факторы негативно влияют на продукцию целевого вещества соответствующим продуцентом.

Активный транспорт целевого метаболита из клетки способен не только решить перечисленные выше проблемы, но также дополнительно усилить биосинтез данного соединения в клетке, поскольку благодаря его оттоку снижается внутриклеточная концентрация, что является сигналом для синтеза новых молекул.

К началу этой работы данные о системах экспорта пуриновых нуклеозидов у микроорганизмов в литературе отсутствовали. Поэтому поиск и изучение генов, кодирующих белки-экспортеры пуриновых нуклеозидов, представлялись нам важными задачами, имеющими как прикладное, так и научное значение.

1.2.4.1. Поиск и идентификация генов, участвующих в экскреции пуриновых нуклеозидов у *E. coli*

Идентификация гена *yicM*. Поиск генов экспорта пуриновых нуклеозидов у *E. coli* был проведен с использованием описанной выше для поиска генов 5'-нуклеотидаз системы селекции по устойчивости к нуклеозидам. Мы предположили, что повышенная экскреция пуриновых нуклеозидов из клетки за счет амплификации генов-экспортеров позволит избежать их внутриклеточного превращения в нуклеотиды, а значит обеспечить рост GS72 на средах с инозином и гуанозином. С помощью этого метода был отобран фрагмент генома *E. coli*, содержащий ОРС *yicM* с неизвестной функцией, для которой на момент исследования не были известны старты транскрипции и трансляции, которые были определены в ходе данной работы (Рис. 17).

А.

```

Genbank (GTG)
5' -CGCCGTGACCTGTCGGGTGGATAAGACGTTCC
ACGCCGCATCCGGTAATCTTTGCCCTGTCCCGT
TTCGATCTTAACTCCAGCTCAAGCAACACCGTA
-35
AAAGTTGCAAAAACGTTAAATGCGTCACACATT
SWISS-PROT (ATG1)
-10
TCAATGTTAAAGTGGTCGGCTTTTCCCCTGAAA
RBS EcoGene (ATG2)
CATGCCACGGCTAACACCATGAGTGAATTT-3'
M S E F
  
```

Б.

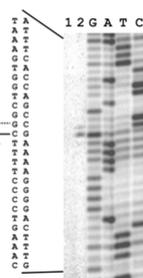


Рис. 17. Предполагаемые (GTG, ATG1) и истинный (ATG2) старты трансляции (А) и старт транскрипции *yicM* (Б).

Анализ предсказанной аминокислотной последовательности *YicM in silico* показал, что это гидрофобный белок с 12 трансмембранными сегментами, принадлежащий семейству 2.A.1.2. DHA1 (Drug:H⁺ Antiporter-1) большого суперсемейства транспортных белков MFS, представители которого осуществляют транспорт различных соединений, используя протон-движущую силу. Гомологи

YicM, YdeA из *E. coli* и YdhL (PbuE) из *B. subtilis* были описаны в литературе как экспортеры арабинозы и пуриновых оснований, соответственно. Мы показали, что инактивация гена увеличивает чувствительность клеток к нуклеозидам, в то время как его сверхэкспрессия придает устойчивость к инозину, аденозину и гуанозину, что позволило предсказать, что YicM осуществляет функцию транспорта пуриновых нуклеозидов из клеток. Ряд проведенных ниже исследований подтвердил это предположение.

Сверхэкспрессия *yicM* замедляет рост штамма *E. coli* на пуриновых нуклеозидах в качестве единственного источника углерода. По сравнению со штаммом дикого типа (MG1655) и штаммом с инактивированным геном *yicM* (MG1655Δ*yicM*), штамм со сверхэкспрессией *yicM* (MG1655P_{*nlpD*}-*yicM*) рос на пуриновых рибонуклеозидах (инозине, гуанозине и аденозине) значительно хуже, тогда как рост всех штаммов на всех других исследованных источниках углерода практически не отличался (Рис. 18). Это может свидетельствовать об усилении экскреции нуклеозидов в этом штамме.

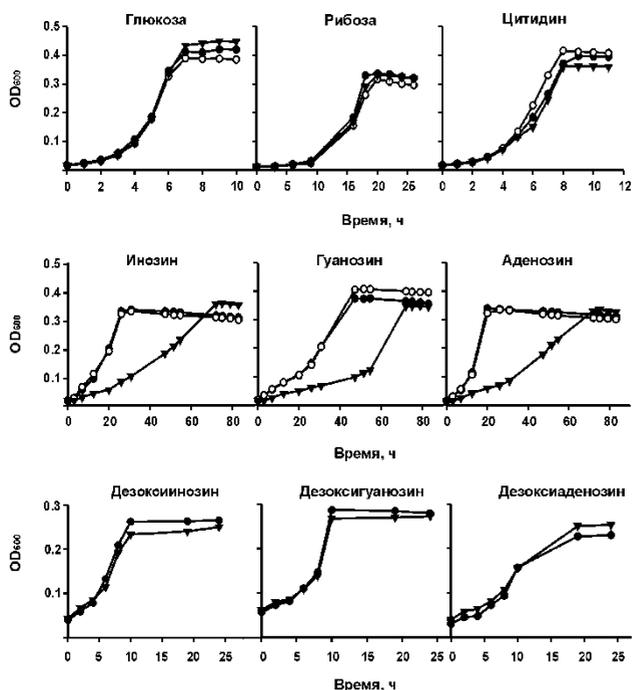


Рис. 18. Эффект сверхэкспрессии и инактивации гена *yicM* на рост штамма *E. coli* MG1655 на минимальной среде с различными источниками углерода (2 мМ). Закрашенные кружки – штамм MG1655, незакрашенные кружки – штамм MG1655Δ*yicM*, закрашенные треугольники – штамм MG1655P_{*nlpD*}-*yicM*. Каждый эксперимент был повторен не менее двух раз, и показаны репрезентативные результаты (отклонение составляло не более 5%)

Сверхэкспрессия *yicM* увеличивает внеклеточное накопление инозина штаммом *E. coli* с нарушенной деградацией пуриновых рибонуклеозидов. Штаммы *E. coli* с неактивной пуриннуклеозидфосфорилазой (мутанты *deoD*) способны накапливать пуриновые нуклеозиды в среде культивирования, а при повышенной экспрессии гена, отвечающего за их экскрецию накопление, должно

увеличиться. Действительно, в стационарной фазе роста в супернатанте клеточной суспензии TG1deoD обнаруживались лишь следовые количества инозина, тогда как штамм TG1deoDP_{nlpD}-*yicM* накапливал до 10 мг/л этого нуклеозида.

Сверхэкспрессия *yicM* ослабляет индукцию экспрессии *deoCABD* пуриновыми нуклеозидами. Приведенные выше данные указывают на усиление экскреции инозина и снижение его внутриклеточной концентрации в штаммах с повышенной экспрессией *yicM*. Действительно, используя транскрипционное слияние промоторной области deoP3 и структурной части гена *lacZ* в составе плазмиды pMWF-deoP3 мы показали, что экспрессия оперона *deoCABD* с внутреннего промотора deoP3, который у *E. coli* индуцируется инозином и гуанозином, существенно снижается при сверхэкспрессии *yicM* (Таблица 13).

Таблица 13. Влияние сверхэкспрессии гена *yicM* на индукцию экспрессии пуриновыми нуклеозидами с промотора deoP3.

| Штамм | Статус <i>yicM</i> | Активность β-галактозидазы, нмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹ | | | |
|--------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
| | | нет | Инозин | Гуанозин | Аденозин |
| GS224 (pMWF-deoP3) | Дикий тип | 928±52 | 3078±86 | 2047±147 | 2053±61 |
| GS258 (pMWF-deoP3) | P _{nlpD} - <i>yicM</i> | 896±38 | 1272±103 | 1187±24 | 927±52 |

Пуриновые нуклеозиды были добавлены до концентрации 100 мкг мл⁻¹

1.2.4.2. Положительный эффект сверхэкспрессии *yicM* на накопление инозина штаммами-продуцентами

Влияние сверхэкспрессии *yicM* на накопление пуринов в среде было исследовано в штамме-продуценте FADRaddedd (pMWKQ). Количество инозина в среде через 6 ч культивирования в богатой среде было примерно в 3 раза выше в случае штамма с усиленной экспрессией гена *yicM* (FADRaddeddP_{nlpD}-*yicM* (pMWKQ)), чем в случае исходного штамма FADRaddedd (pMWKQ) (Рис. 19, А). Важно, что уменьшение электрохимического градиента протонов через цитоплазматическую мембрану путем добавления протонофора, карбонилцианида м-хлорфенилгидразона (CCCP), приводило к резкому снижению скорости экскреции инозина (Рис. 19, А). Эти результаты дополнительно подтверждают участие YicM в экскреции инозина, а также указывают на то, что транспорт происходит за счет энергии мембранного потенциала.

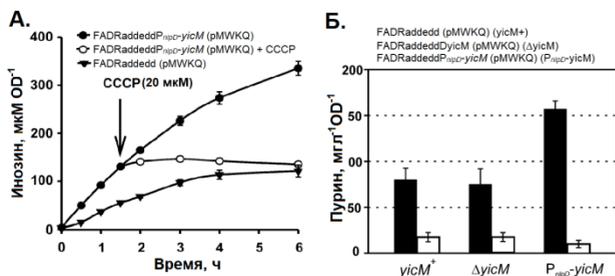


Рис. 19. Влияние сверх-экспрессии *yicM* на (А) скорость экскреции и (Б) внеклеточное накопление нуклеозидов в пересчете на оптическую плотность (OD) культуры; закрашенные столбцы, инозин; незакрашенные столбцы, гипоксантин.

Концентрация инозина в пересчете на единицу биомассы (продуктивность), которую определяли после культивирования штаммов в ферментационной среде

(Рис. 19, Б), была примерно в 2 раза выше у штамма FADRaddeddP_{nlpD}-*yicM* (pMWKQ), чем у FADRaddedd (pMWKQ). Кроме того, штамм с повышенной экспрессией *yicM* накапливал меньше гипоксантина, чем родительский штамм, что свидетельствует о преимущественном выбросе нуклеозида по сравнению с основанием (Рис. 19, Б).

Положительное влияние усиления экспрессии гена *yicM* на накопление пуриновых нуклеозидов сохранялось и в неродственном грамположительном организме, штамме-продуcente инозина и гуанозина *B. amyloliquefaciens* AJ1991, содержащего плазмиду pLF-*yicM* или инсерцию экспрессионной кассеты Ppur-*yicM* в хромосомном локусе *aprE* (Таблица 14).

Таблица 14. Влияние сверхэкспрессии гена *yicM* на накопление инозина и гуанозина в среде штаммом *B. amyloliquefaciens* AJ1991.

| Штамм | OD ₆₀₀ | Инозин, г л ⁻¹ | Гуанозин, г л ⁻¹ |
|----------------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------------|
| AJ1991 (pLF22) | 26.1 | 2.7 ± 0.4 | 2.1 ± 0.1 |
| AJ1991 (pLF- <i>yicM</i>) | 28.3 | 4.7 ± 0.4 | 2.6 ± 0.2 |
| AJ1991Ppur- <i>yicM</i> | 26.6 | 6.8 ± 0.6 | 2.0 ± 0.2 |

Изучение регуляции экспрессии *yicM* с помощью трансляционных слияний его регуляторной области со структурной частью репортерного гена *lacZ* (на плазмиде pMWF-P_{yicM}) показало, что экспрессия с промотора *yicM* в 2,6 раза выше при росте штаммов на минимальной среде M9, а также в стационарной фазе роста (Рис. 20, А, В).

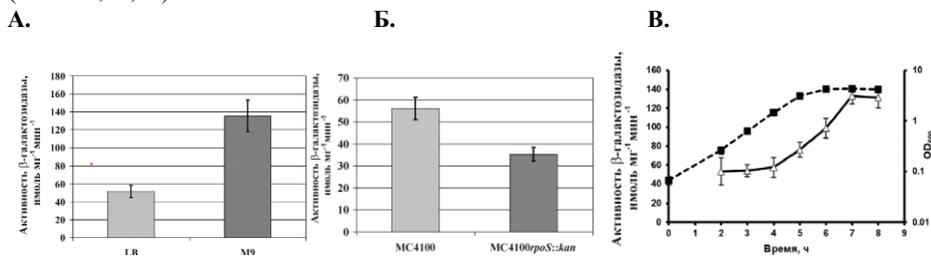


Рис. 20. Влияние состава питательной среды, LB и M9 (А), аллельного состояния гена *rhoS* в среде LB (Б) и фазы роста культуры в среде M9 (В) на экспрессию гена *nepI*. Культуры штаммов MC4100 (pMWF-P_{yicM}) (А), (В) и MC4100 (pMWF-P_{yicM}) и MC4100rhoS::kan (pMWF-P_{yicM}) (Б), выращенные в LB или M9, разводили в 50 раз в такой же среде и культивировали с аэрацией при 37 °С.

Итак, совокупность полученных данных указывает на участие продукта гена *yicM* в эффлюксе пуриновых рибонуклеозидов, в первую очередь инозина, поэтому ген *yicM* был нами переименован в *nepI* (nucleoside efflux permease – inosine).

1.2.4.3. Поиск и изучение генов, участвующих в экскреции пуринов у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*

Роль гена *pbuE* и его продукта в экскреции пуриновых оснований и пуриновых нуклеозидов. К моменту исследований по теме данной работы продукт гена *pbuE* (*ydhL*) из *B. subtilis* был охарактеризован как экспортер пуриновых

оснований, аденина и гипоксантина. Однако сам белок PbuE и его функции были недостаточно хорошо изучены. Поскольку *E. coli* Nep I и *B. subtilis* PbuE являются гомологичными белками, а сверхэкспрессии гена *B. subtilis pbuE* (*pbuE_{BS}*) и ортоголичного гена из *B. amyloliquefaciens* (*pbuE_{BA}*) сообщали устойчивость к ингибирующим концентрациям инозина и аналогам пуриновых оснований, а также повышали накопление экзогенного инозина штаммом *E. coli* с нарушенной деградацией нуклеозидов, мы предположили, что пуриновые нуклеозиды также могут быть субстратами для PbuE.

Изучение регуляции экспрессии *pbuE_{BA}* в штамме *E. coli* GS262, дефектному по деградации пуриновых нуклеозидов, с помощью трансляционных слияний регуляторных областей дикого (*pbuE_{BA}*) и мутантного (*pbuE_{T→C}*) гена с репортерным геном *lacZ* (*pbuE_{BA}'-lacZ* и *pbuE_{T→C}'-lacZ*) показало, что гетерологичная экспрессия гена *pbuE* в *E. coli* сохранила черты нативной регуляции, охарактеризованные ранее у *B. subtilis*, а именно, активацию экспрессии аденином и независимое от аденина усиление экспрессии у мутанта *pbuE_{T→C}* в результате мутации в А-боксе (Рис. 21). Этот результат подтверждает независимость экспрессии *pbuE*, регулируемой рибопереключателем, от регуляторных факторов белковой природы, присутствующих в клетках бактерий.

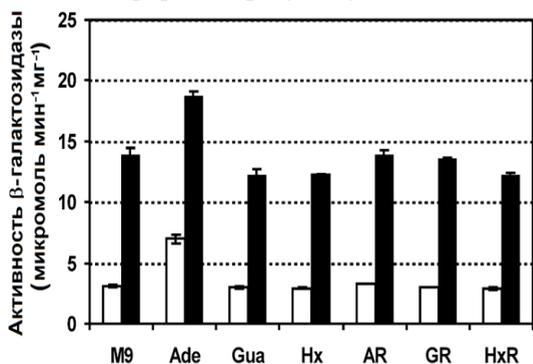


Рис. 21. Влияние пуринов в среде и мутации Т→С на экспрессию трансляционных слияний *pbuE_{BA}'-lacZ* и *pbuE_{T→C}'-lacZ* у *E. coli*. Незакрашенные столбики – GS262 (pMWF1) (*pbuE_{BA}'-lacZ*); закрашенные столбики – GS262 (pMWF2) (*pbuE_{T→C}'-lacZ*). Активность измеряли после культивирования на минимальной среде с глюкозой без пуринов (M9), с аденином (Ade), гуанином (Gua), гипоксантином (Hx), аденозином (AR), гуанозином (GR), или инозином (HxR).

1.2.4.4. Положительный эффект сверхэкспрессии *pbuE* на продукцию пуринов в штаммах-продуцентах

Сверхэкспрессия гена *pbuE* усиливает экскрецию инозина и гуанозина соответствующим штаммом-продуцентом на основе *Bacillus*. У модельного продуцента AJ1991 в зависимости от уровня сверхэкспрессии *pbuE_{BA}* увеличивалось внеклеточное накопление гуанозина и, в большей степени, инозина (на 30–40%). В то же время инактивация *pbuE_{BA}* приводила к значительному снижению накопления инозина (и в большей степени гуанозина) в штамме AJ1991*pbuE::cat* (Рис. 22).

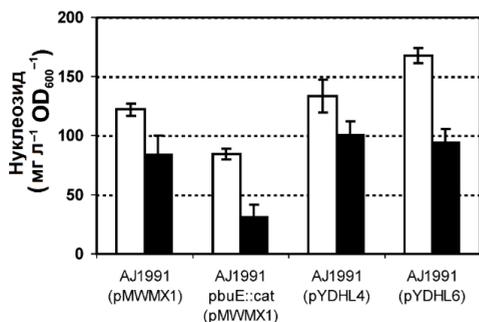


Рис. 22. Влияние уровня экспрессии *pbuE*_{BA} на экзогенное накопление пуриновых производных штаммом AJ1991. Незакрашенные столбики, накопление инозина; закрашенные столбики, накопление гуанозина. *pYDHL4* и *pYDHL6* – плазмиды для экспрессии *pbuE*_{BA} и *pbuE*_{T→C}, соответственно.

Гетерологичная экспрессия гена *pbuE* усиливает экскрецию инозина и гипоксантина в соответствующих штаммах-продуцентах *E. coli*. Повышение экспрессии *pbuE* в 2 раза увеличивало накопление инозина (Рис. 23, А), и на 66% – гипоксантина (Рис. 23, Б) штаммах-продуцентах на основе *E. coli*, FADRadd (*pMWKQ*) и GS192, соответственно.

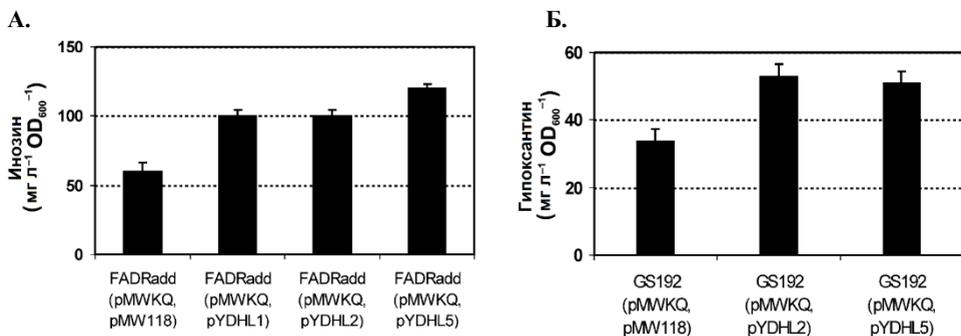


Рис. 23. Влияние уровня экспрессии *pbuE*_{BA} на экзогенное накопление инозина (А) и гипоксантина (Б) соответствующими штаммами-продуцентами *E. coli*. *pYDHL1*, *pYDHL2* и *pYDHL5* – плазмиды для экспрессии *pbuE*_{BS}, *pbuE*_{BA} и *pbuE*_{T→C}, соответственно.

Таким образом, бактериальный *pbuE* способен экспрессироваться в *E. coli* под контролем собственных регуляторных элементов, а его продукт может функционировать как экспортер пуриновых нуклеозидов и пуриновых оснований не только в нативном грамположительном организме, но и в неродственной грамотрицательной бактерии *E. coli*. Эта важная особенность белков экспорта может быть применена при конструировании штаммов-продуцентов с использованием гетерологичных генов. На основе полученных экспериментальных данных можно сделать некоторые предположения о физиологической роли экспортера PbuE в клетках. Основным источником внутриклеточного аденина, индуктора экспрессии *pbuE*, является АМР. Известно, что концентрация АМР коррелирует с энергетическим статусом клеток, выраженным в виде аденилатного энергетического заряда (ЭЗ). ЭЗ может быть вычислен по формуле $([ATP] + 0,5 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$. Резкое снижение ЭЗ фатально для клеток, и одним из способов его стабилизации является увеличение мольной доли АТФ и АДФ

за счет удаления АМР. У *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* АМР расщепляется до аденозина, а затем до аденина путем последовательного действия 5'-нуклеотидаз и пурииннуклеозидфосфорилаз. Накопленный аденин может индуцировать экспрессию *pbuE*, усиливая таким образом не только экспорт аденина, но и аденозина. Можно предположить, что экскреция пуриновых нуклеозидов при некоторых условиях может быть более благоприятной для клеток, чем их деградация и экскреция соответствующих пуриновых оснований. Следовательно, помимо роли PbuE в поддержании соответствующих пулов пуриновых оснований и защите клеток от токсичных аналогов пуриновых оснований, PbuE можно рассматривать как часть механизма, стабилизирующего ЭЗ клетки. В комбинации с 5'-нуклеотидазной активностью эффлюкс пуриновых нуклеозидов может быть востребован в условиях нерегулируемого биосинтеза (сверхсинтеза) пуриновых нуклеотидов, чтобы избежать превышения их физиологических концентраций в клетке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важным результатом представленной работы является разработка удобного генно-инженерного инструментария для метаболической инженерии штаммов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, которые являются «рабочими лошадками» биотехнологии. Разработанный подход позволяет без селекции по фенотипическому признаку или устойчивости к антибиотикам вводить в хромосому бесшовные, немаркированные генетические модификации любого типа (делеции, вставки и точечные мутации). К преимуществам метода также относится его применимость для штаммов, которые не обладают природной компетентностью, что часто бывает характерно для штаммов-продуцентов. В этом ему уступают многие даже очень эффективные методы, такие как CRISPR/Cas технологии. Благодаря надежности разработанного метода и возможности вводить генно-инженерные модификации неограниченное число раз, этот метод активно используется для получения штаммов как в лабораториях АО «АГРИ», так и в других лабораториях в нашей стране и за рубежом.

Вторым важнейшим направлением исследований, представленных в данной работе, было изучение ключевых факторов, позволяющих улучшить биосинтез и экскрецию целевого продукта у продуцентов инозина и гуанозина, а также рибофлавина и АІСAr, на основе бацилл. В качестве таких факторов были выявлены мутации, позволяющие убрать негативную регуляцию и усилить экспрессию генов биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*. Для создания в клетках достаточного пула предшественника пуриновых нуклеотидов, PRPP, впервые были получены и охарактеризованы мутантные PRPP-синтетазы из *B. amyloliquefaciens*, устойчивые к ингибированию пуриновыми нуклеотидами, а также способные к активному катализу при пониженных концентрациях неорганического фосфата в клетке. Экспрессия таких мутантных PRPP-синтетаз, Prs_{N120S} и Prs_{L135I}, оказывала выраженный положительный эффект на накопление и выход инозина и гуанозина в модельных штаммах-продуцентах, что открывает перспективы для использования новых мутаций в промышленных продуцентах.

Для обеспечения эффективной конверсии нуклеотидов в нуклеозиды были найдены и изучены малоизвестные у бацилл гены 5'-нуклеотидаз. С помощью разных подходов, включая и впервые предложенный в этой работе оригинальный

подход, основанный на прямом отборе генов 5'-нуклеотидаз в специально сконструированном штамме, у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* были идентифицированы гены *yutF*, *yitU* и *yueE*, продукты которых осуществляют гидролиз различных нуклеотидов. Впервые была исследована регуляция гена *yutF* и обнаружено, что он является компонентом трицистронного оперона *yutDEF*, а его экспрессия подвержена положительной авторегуляции, которая усиливается в условиях избытка неорганических фосфатов. Для изучения физиологической роли продуктов генов *yutF*, *yitU* и *yueE* в клетках рекомбинантные белки YutF, YitU и YueE были биохимически охарактеризованы. Это позволило выяснить важную роль YitU в биосинтезе рибофлавина, а также в дефосфорилировании AICAR и пуриновых нуклеотидов. Помимо научного интереса, исследование 5'-нуклеотидаз имеет важное прикладное значение. Так, на примере *yitU* было продемонстрировано, что его сверхэкспрессия улучшает свойства штаммов-продуцентов пуриновых нуклеозидов, рибофлавина и AICAr.

Другим важнейшим достижением представленной работы является идентификация генов, продукты которых обеспечивают экскрецию пуриновых нуклеозидов из клеток грамотрицательных и грамположительных бактерий, *nepI* у *E. coli* и *pbuE* (*ydhL*) у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. Также было показано возможное участие в экспорте пуриновых соединений некоторых других генов *E. coli* (*rhtA*, *leuE* и др.), ранее охарактеризованных как гены экспорта аминокислот. В приведенных исследованиях были определены точки старта транскрипции и трансляции гена *nepI*, изучена регуляция экспрессии этого гена и установлено, что его экспрессия увеличивается в стационарной фазе роста, а также при росте штаммов на минимальной среде. Исследование регуляции экспрессии гена экспорта пуриновых соединений, *B. subtilis pbuE*, под контролем собственных регуляторных элементов в клетках *E. coli* подтвердили белок-независимый тип регуляции по механизму аденин-зависимого рибопереклювателя. Большое практическое значение имеют результаты работы, демонстрирующие, что сверхэкспрессию генов *yicM* и *pbuE* можно успешно использовать для увеличения накопления пуриновых нуклеозидов штаммами-продуцентами, в том числе и на основе неродственных микроорганизмов, где эти гены сохраняют свои функции.

Таким образом, настоящая работа не только пополнила научные знания о генетической регуляции метаболизма грамположительных и грамотрицательных бактерий, но и создала основы для метаболической инженерии продуцентов пуриновых нуклеозидов, а также совершенствования продуцентов рибофлавина и AICAr.

Выводы

1. Путем оптимизации условий электротрансформации и разработки на основе термочувствительной по репликации плазмиды простого и эффективного метода замещения аллелей рекомбинацией был создан инструментарий для редактирования геномов и получения немаркированных штаммов промышленно значимых бацилл, *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, включая те, которые утратили природную компетентность.

2. Показано, что нарушение негативной регуляции экспрессии генов пуринового оперона путём удаления последовательности, отвечающей за

образование терминаторной шпильки гуанинового рибопереклочателя, а также введение мутации taAGat→taTAat в -10 область промотора этого оперона, и, в большей степени, комбинация этих двух генетических модификаций увеличивают уровень экспрессии пуринового оперона. При введении указанных мутаций в хромосому штаммов-продуцентов внеклеточное накопление и выход инозина в расчете на потребленную глюкозу повышаются в 1,8 и 1,6 раза, соответственно.

3. Впервые биохимически охарактеризована PRPP-синтетаза из *B. amyloliquefaciens*, получены мутанты N120S и L135I, которые придают ферменту устойчивость к ингибированию ADP и GDP, а также снижают потребность в неорганическом фосфате для активации. Мутации N120S и L135I в PRPP-синтетазе увеличивают продукцию пуринов штаммами-продуцентами на основе *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*.

4. Предложен и апробирован подход, позволяющий осуществлять поиск новых генов, участвующих в дефосфорилировании нуклеотидов и транспорте пуриновых нуклеозидов из клеток (экспорте).

5. У *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* идентифицированы гены 5'-нуклеотидаз, *yutF*, *yitU* и ген фосфодиэстеразы *yueE*.

6. Впервые показано, что продукт гена *yutF* обладает фосфогидролазной активностью в отношении ряда пуриновых и пиримидиновых 5'-нуклеотидов, предпочитительно 5'-нуклеозидмонофосфатов, проявляя наибольшее сродство в отношении 5'-XMP, PRPP и R5P.

7. Впервые показано, что продукт гена *yitU* обладает 5'-нуклеотидазной активностью в отношении широкого спектра дезоксирибо- и рибонуклеозидмонофосфатов, наиболее предпочтительным субстратом для него является FMN.

8. Продукт гена *yueE* впервые охарактеризован как фосфодиэстераза, обладающая сродством к циклическому аденозинмонофосфату, 2',3'-cAMP.

9. Впервые изучена регуляция гена *yutF*, показано, что он является компонентом трицистронного оперона *yutDEF* и что продукт гена, белок YutF, положительно влияет на экспрессию этого оперона. Обнаружено, что положительная авторегуляция усиливается в условиях избытка неорганических фосфатов.

10. Для штаммов *Bacillus* показана зависимость накопления пуриновых нуклеозидов, а также AICAg и рибофлавина от статуса гена *yitU*: снижение накопления при делеции гена и увеличение при его сверхэкспрессии. Впервые продемонстрирована перспективность использования амплификации гена *yitU* для повышения продукции пуриновых нуклеозидов, рибофлавина и AICAg.

11. Впервые у *E. coli*, *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* были найдены гены, участвующие в экспорте пуриновых нуклеозидов, в частности, *nepI* (*yicM*) из *E. coli* и *pbuE* (*ydhL*) из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. Определены точки старта транскрипции и трансляции гена *nepI*, показано, что экспрессия с промотора *nepI* увеличивается в стационарной фазе роста, а также при росте штаммов на минимальной среде. Показано, что индукция аденином зависимой от рибопереклочателя экспрессии *pbuE* сохраняется в неродственном организме *E. coli*.

12. Впервые показан положительный эффект сверхэкспрессии генов экспорта пуриновых нуклеозидов *nepI* и *pbuE* на продукцию этих соединений штаммами-продуцентами на основе *B. amyloliquefaciens* и *E. coli*. Оказалось, что функции этих генов сохраняются при их экспрессии в неродственных бактериях.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в научных журналах

1. **Zakataeva N.P.** (2021). Microbial 5'-nucleotidases: their characteristics, roles in cellular metabolism, and possible practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 105(20):7661-81.
2. Yusupova Y.R., Skripnikova V.S., Kivero A.D., **Zakataeva N.P.** (2020). Expression and purification of the 5'-nucleotidase YitU from *Bacillus* species: its enzymatic properties and possible applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 104(7):2957-72.
3. Kharchenko M.S., Teslya P.N., Babaeva M.N., **Zakataeva N.P.** (2018). Improving the selection efficiency of the counter-selection marker *pheS** for the genetic engineering of *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Microbiol Methods.* 148:18-21.
4. **Zakataeva N.P.**, Romanenkov D.V., Yusupova Y.R., Skripnikova V.S., Asahara T., Gronskiy S.V. (2016). Identification, Heterologous Expression, and Functional Characterization of *Bacillus subtilis* YutF, a HAD Superfamily 5'-Nucleotidase with Broad Substrate Specificity. *PLoS One.* 11(12):e0167580.
5. **Закатаева Н.П.**, Юсупова Ю.Р., Романенков Д.В., Лившиц В.А. (2013). Современные методы генетического конструирования промышленных штаммов на основе бактерий рода *Bacillus*. *Биотехнология.* 5:8-23.
6. **Zakataeva N.P.**, Romanenkov D.V., Skripnikova V.S., Vitushkina M.V., Livshits V.A., Kivero A.D., Novikova A.E. (2012). Wild-type and feedback-resistant phosphoribosyl pyrophosphate synthetases from *Bacillus amyloliquefaciens*: purification, characterization, and application to increase purine nucleoside production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93(5):2023-33.
7. Sheremet A.S., Gronskiy S.V., Akhmadyshin R.A., Novikova A.E., Livshits V.A., Shakulov R.S., **Zakataeva N.P.** (2011). Enhancement of extracellular purine nucleoside accumulation by *Bacillus* strains through genetic modifications of genes involved in nucleoside export. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38(1):65-70.
8. Asahara T., Mori Y., **Zakataeva N.P.**, Livshits V.A., Yoshida K., Matsuno K. (2010). Accumulation of gene-targeted *Bacillus subtilis* mutations that enhance fermentative inosine production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87(6):2195-207.
9. **Zakataeva N.P.**, Nikitina O.V., Gronskiy S.V., Romanenkov D.V., Livshits V.A. (2010). A simple method to introduce marker-free genetic modifications into the chromosome of naturally nontransformable *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85(4):1201-9.
10. **Zakataeva N.P.**, Gronskiy S.V., Sheremet A.S., Kutukova E.A., Novikova A.E., Livshits V.A. (2007). A new function for the *Bacillus* PbuE purine base efflux pump: efflux of purine nucleosides. *Res Microbiol.* 158(8-9):659-65.

11. **Закатаева Н.П.**, Кутукова Е.А., Гронский С.В., Трошин П.В., Лившиц В.А., Алёшин В.В. (2006). Экспорт метаболитов белками семейств DMT и RhtB и их возможная роль в межклеточной коммуникации. *Микробиология*. 75(4):509.
12. Gronskiy S.V., **Zakataeva N.P.**, Vitushkina M.V., Ptitsyn L.R., Altman I.B., Novikova A.E., Livshits V.A. (2005). The *yicM* (*nepI*) gene of *Escherichia coli* encodes a major facilitator superfamily protein involved in efflux of purine ribonucleosides. *FEMS Microbiol Lett*. 250(1):39-47.
13. Kutukova E.A., Livshits V.A., Altman I.P., Ptitsyn L.R., Zyatdinov M.H., Tokmakova I.L., **Zakataeva N.P.** (2005). The *yeaS* (*leuE*) gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its expression. *FEBS Lett*. 579(21):4629-34.

Патенты и заявки на изобретение

1. Гронский С.В., **Закатаева Н.П.**, Скрипникова В.С. (2020). Способ получения уридина и уридин-монофосфата. Патентная заявка РФ RU2018124860.
2. Andrianova E., Kharchenko M., **Zakataeva N.**, Voroshilova E., Krylov A, Malykh E., Mashko S., Stoyanova N., Baboshin M., Golubeva L., Kovaleva E., Shupletsov M. (2020). Method for producing target substance by bacterial fermentation. WO2020071538.
3. Юсупова Ю.П., **Закатаева Н.П.**, Скрипникова В.С., Гронский С.В., Ахмадышин Р.А. (2016). Способ получения пуриновых рибонуклеозидов и рибонуклеотидов с использованием бактерии рода *Bacillus*, в которой сверхэкспрессирован ген *yuеE*. Патентная заявка Тайланда TH150859.
4. **Закатаева Н.П.**, Юсупова Ю.П., Скрипникова В.С., Сошникова О.Н., Романенков Д.В., Шерemet А.С. (2015). Способ получения пуриновых рибонуклеозидов и рибонуклеотидов с использованием бактерии рода *Bacillus*, в которой активность фосфоглицератмутазы понижена. Патентная заявка Тайланда TH138905.
5. Гронский С.В., Романенков Д.В., **Закатаева Н.П.**, Асахара Т. (2011). Способ получения пуриновых рибонуклеозидов и рибонуклеотидов. Патент РФ RU2422510.
6. **Закатаева Н.П.**, Лившиц В.А., Мацуно К., Романенков Д.В., Витушкина М.В., Гронский С.В., Кутукова Е.А. (2010). Мутантная фосфорибозил-пирофосфатсинтетаза, ДНК, кодирующая ее, бактерия, содержащая указанную ДНК, способ продукции пуриновых нуклеозидов и способ продукции пуриновых нуклеотидов. Патент РФ RU2403286.
7. Gronskiy S.V., Romanenkov D.V., **Zakataeva N.P.**, Asahara T. (2010). A method for producing purine ribonucleosides and ribonucleotides. WO201038903.
8. Kutukova E.K., **Zakataeva N.P.**, Livshits V.A. (2009). A method for producing purine nucleosides and nucleotides by fermentation using a bacterium belonging to the genus *Escherichia* or *Bacillus* EP2097512A1.
9. Кутукова Е.А., **Закатаева Н.П.**, Лившиц В.А. (2009). Способ продукции пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов методом ферментации с использованием бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* или *Bacillus*. Патент РФ RU2365622.

10. Лившиц В.А., Казаринова Л. А., **Закатаева Н.П.**, Кутукова Е.А., Херсонская А.М. (2008). Штаммы бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*-продуценты инозина и способ продукции инозина с их использованием. Патент РФ RU2333949.
11. **Закатаева Н.П.**, Лившиц В.А., Гронский С.В., Кутукова Е.А., Новикова Е.А., Козлов Ю.И. (2007). Белок YdhL из *Bacillus amyloliquefaciens*, фрагмент ДНК, бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia* или *Bacillus*, – продуцент пуриновых нуклеозидов, способ получения пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов. Патент РФ RU2294962.
12. **Закатаева Н.П.**, Гронский С.В., Витушкина М.В., Лившиц В.А. (2006). Способ получения инозина и 5'-инозиновой кислоты методом ферментации с использованием бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*. Патент РФ RU2271391.
13. Livshits V.A., Kazarinova L.A., **Zakataeva N.P.**, Kutukova E.K., Hersonskaja A.M. (2006). Purine nucleoside-producing strain and method for producing purine nucleoside. JP2007075108A
14. **Закатаева Н.П.**, Лившиц В.А., Гронский С.В. (2005). Способ получения инозина и 5'-инозиновой кислоты, штамм *Escherichia coli* - продуцент инозина. Патент РФ RU2244003.
15. Гронский С.В., **Закатаева Н.П.**, Лившиц В.А. (2005). Способ получения инозина и 5'-инозиновой кислоты, штамм *Escherichia coli* - продуцент инозина. Патент РФ RU2244004
16. **Zakataeva N.P.**, Livshits V.A., Gronskiy S.V., Kutukova E.K., Novikova A.E., Kozlov Yu.I. (2005) Method for producing purine nucleosides and nucleotides by fermentation using bacterium belonging to the genus *Bacillus* or *Escherichia*. WO2005095627.
17. Лившиц В.А., **Закатаева Н.П.**, Гронский С.В., Витушкина М.В., Новикова А.Е. (2004). Способ получения пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов, штамм-продуцент пуриновых нуклеозидов (варианты). Патент РФ RU2239656.
18. **Zakataeva N.P.**, Gronskiy S.V., Vitushkina M.V., Livshits V.A. (2004). Method for producing inosine and 5'-inosinic acid by fermentation using bacterium belonging to the genus *Escherichia*. WO200523850A3
19. Лившиц В.А., Казаринова Л.А., Гронский С.В., Кутукова Е.А., **Закатаева Н.П.** (2003). Способ получения ХМР методом ферментации с использованием мутантных штаммов коринеформных бактерий. Патент РФ RU2209249

Избранные тезисы докладов

1. **Zakataeva N.P.** (2018). Export of amino acids and other metabolites by bacterial cells: current knowledge and application prospects in industrial biotechnology. Proceedings of 10th Edition of International Conference on Advanced Microbiology&Education, London, UK, June 14-16th, 2018.
2. Стойнова Н.В., Альтман И.Б., Гераскина Н.В., Горшкова Н.В., **Закатаева Н.П.**, Игонина О.Н., Козаева Е., Крамор Р.В., Крылов А.А., Малых Е.А., Машко С.В., Птицын Л.Р., Саврасова Е.А., Самсонов В.В., Смирнов С.В., Сычева Е.В., Токмакова И.Л., Ямпольская Т.А. (2018). Комбинирование новых и традиционных подходов метаболической инженерии для микробной

продукции канонических аминокислот и схожих соединений. Биотехнология спецвыпуск, 2018 С. 26

3. Mashko S.V., Stoynova N.V., **Zakataeva N.P.**, Ptitsyn L.R., Smirnov S.V., Krylov A.A., Altman I.B., Geraskina N.V., Gorshkova N.V., Igonina O.N., Kozaeva E., Kramor R.V., Malykh E.A., Samsonov V.V., Savrasova E.A., Sycheva E.V., Tokmakova I.L. and Yampolskaya T.A. (2018). Combination of Novel Technologies with Traditional Metabolic Engineering Strategies for Microbial Production of Amino Acids and Related Desirable Chemicals. *Metabolic Engineering* 12, June 2018, A518878.
4. Yusupova Yu.R., Kurova V.S., Kivero A.D. and **Zakataeva N.P.** (2017). Overexpression of 5'-nucleotidase YitU from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* increases 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAr) and riboflavin production. Proceedings of the Nth International Congress of the Union of Microbiological Societies (IUMS), Singapore, 2017, PO085 p.113.
5. Yusupova Yu.R., Skripnikova V.S., **Zakataeva N.P.** (2014). Gene cloning and characterization of a new 5'-nucleotidase from *Bacillus subtilis*. Proceedings of the 16th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Fortaleza, Brazil, Sept, 14-19th, 2014, A257:586-7.
6. Romanenkov D.V., Skripnikova V.S., Yusupova Yu.R., **Zakataeva N.P.** (2012). Gene cloning, expression and characterization of nucleotidase with a broad substrate specificity from *Bacillus subtilis*. Proceedings of the 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 12-16 September 2012. South Korea, Daegu.
7. Romanenkov D.V., Skripnikova V.S., Livshits V.A., **Zakataeva N.P.** (2011). Biochemical features and application of feedback-resistant phosphoribosyl pyrophosphate synthetases from *Bacillus*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (IUMS2011) 6-10 September 2011. Sapporo. Japan.
8. **Zakataeva N.P.** and Livshits V.A. (2011). Bacterial amino acid efflux transporters: identification, properties and application in biotechnology. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (IUMS2011) 6-10 September 2011. Sapporo. Japan.
9. **Zakataeva N.P.**, Sheremet A.S., Gronskiy S.V., and Livshits V.A. (2009). Enhancement of extracellular purine nucleoside and AICA ribonucleoside accumulation by *Bacillus* strains through the genetic modification of genes involved in nucleoside export. BioMicroWorld2009 Lisbon, Portugal, 2-4 December 2009, F141
10. Лившиц В.А., **Закатаева Н.П.** (2008). Активный транспорт метаболитов из клеток бактерий: физиологическая роль и практическое применение. Международная школа - конференция «Генетика микроорганизмов и биотехнология», Пущино, 20-24 октября 2008, С.13.