АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ АДЖИНОМОТО-ГЕНЕТИКА» (АО «АГРИ»)

На правах рукописи

ЗАКАТАЕВА

Наталия Павловна

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

1.5.7. – Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
Доктор биологических наук, профессор
ЛИВШИЦ Виталий Аркадьевич

Москва – 2022

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ 5

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 12

2.1. Клетки *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* как фабрики для биотехнологического производства различных соединений для медицины, пищевой промышленности и сельского хозяйства 12

2.2. Современные подходы к конструированию штаммов бацилл 16

2.2.1. Методы введения генетического материала в клетки штаммов бацилл 17

2.2.2. Получение рекомбинантных штаммов с использованием гомологичной рекомбинации и маркеров для селекции (контрселекции) 18

2.2.3. Получение рекомбинантных штаммов с использованием гетерологичных рекомбинационных систем 21

2.2.4. Получение рекомбинантных штаммов с использованием технологии CRISPR/Cas 23

2.3. Биосинтез пуриновых нуклеотидов у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* 27

2.4. Биосинтез рибофлавина и его производных, FMN и FAD, у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* 32

2.5. Генетический контроль и регуляция метаболизма пуриновых нуклеотидов и рибофлавина у бацилл 34

2.5.1. Пуриновые нуклеотиды 34

2.5.1.1. Регуляция на уровне транскрипции генов 35

2.5.1.2. Регуляция на уровне активности ферментов 38

2.5.2. Рибофлавин 39

2.6. 5'-Нуклеотидазы бактерий и их роль в метаболизме 41

2.6.1. Общая характеристика и классификация 5'-нуклеотидаз 41

2.6.2. Секретируемые 5'-нуклеотидазы 46

2.6.3. Внутриклеточные 5'-нуклеотидазы 47

2.7. Транспорт аминокислот и пуриновых соединений из клеток бактерий 52

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 57

3.1. Химические вещества и ферменты 57

3.2. Бактериальные штаммы, плазмиды, фаги и олигонуклеотиды 57

3.3. Основные методы конструирования штаммов 63

3.4. Среды и культивирование, условия микробной ферментации 63

3.5. Манипуляции с ДНК 65

3.6. Введение в клетки генетического материала 66

3.7. Манипуляции с РНК 68

3.8. Манипуляции с белками 68

3.9. Аналитические методы и определение ферментативных активностей 69

3.10. Определение активности и кинетических характеристик ферментов 70

3.11. Методы работы *in silico* 72

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 74

4.1. Создание генно-инженерного инструментария для рационального конструирования промышленно значимых штаммов *Bacillus* 74

4.1.1. Оптимизация условий введения генетического материала в нетрансформирумые штаммы *Bacillus* 75

4.1.2. Разработка метода введения немаркированных хромосомных генетических модификаций штаммов *Bacillus* 78

4.2. Поиск подходов для изменения генетической регуляции метаболизма бацилл с целью усиления биосинтеза и накопления пуриновых производных 90

4.2.1. Снятие негативной регуляции экспрессии генов пуринового оперона 91

4.2.2. Снятие ретроингибирования PRPP-синтетазы 95

4.2.2.1. *In silico* поиск мутаций устойчивости к ингибированию нуклеотидами у PRPP-синтетаз из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* 97

4.2.2.2. Клонирование, гетерологичная экспрессия дикого и мутантных генов *prs* из *B. amyloliquefaciens*, выделение, очистка и изучение биохимических свойств их продуктов 99

4.2.2.3. Влияние полученных мутаций в PRPP-синтетазе на рост, потребление глюкозы и продукцию пуриновых нуклеозидов у *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* 102

4.2.3. Усиление конверсии пуриновых нуклеотидов в нуклеозиды 106

4.2.3.1. Поиск генов 5'-нуклеотидаз, изучение регуляции их экспрессии и биохимических характеристик продуктов их генов 106

4.2.3.1.1. *In silico* поиск генов, кодирующих 5'-нуклеотидазы у бацилл. Идентификация и характеристика гена *yutF*, изучение регуляции его экспрессии 106

4.2.3.1.2. Прямая фенотипическая селекция генов 5'-нуклеотидаз на устойчивость к пуриновым нуклеозидам, идентификация гена *yueE* и *yitU*, биохимическая характеристика рекомбинантных белков YueE и YitU 116

4.2.3.2. Практическое применение 5'-нуклеотидаз для улучшения свойств штаммов-продуцентов 127

4.2.3.2.1. Положительный эффект сверхэкспрессии *yitU* на продукцию рибофлавина 127

4.2.3.2.2. Положительный эффект сверхэкспрессии *yitU* на продукцию пуриновых нуклеозидов и AICAr 133

4.2.4. Усиление экскреции целевого продукта как важный фактор рационального дизайна продуцентов пуриновых нуклеозидов на основе *E. coli* и штаммов *Bacillus* 137

4.2.4.1. Поиск и идентификация генов, участвующих в экскреции пуриновых нуклеозидов у *E. coli* 138

4.2.4.1.1. Роль гена *yicM* и его продукта в экскреции нуклеозидов 141

4.2.4.1.2. Положительный эффект сверхэкспрессии *yicM* на продукцию инозина в штаммах-продуцентах 146

4.2.4.1.3. Изучение регуляции экспрессии гена *yicM* 147

4.2.4.2. Поиск и изучение генов, участвующих в экскреции пуринов у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* 149

4.2.4.2.1. Роль гена *pbuE* и его продукта в экскреции пуриновых оснований и пуриновых нуклеозидов.....149

4.2.4.2.2. Положительный эффект сверхэкспрессии *pbuE* на продукцию пуринов в штаммах-продуцентах.....152

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ 156

6. ВЫВОДЫ 158

7. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 160

8. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ 188

9. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 193

10. БЛАГОДАРНОСТИ 196

1. ВВЕДЕНИЕ. 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 (IMP) и гуанозинмонофосфат (GMP), а также другие пуриновые соединения используют в пищевой промышленности и медицине в качестве пищевых добавок и лекарственных препаратов, соответственно. Так, IMP и GMP являются естественными факторами усиления вкуса умами (*umami*) и применяются в сочетании с глутаматом натрия для его синергического 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 (GTP), 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 «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. Настоящая

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 грамотрицательной 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 кроссинговера 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, как из-за необходимости получать «бесшовные» рекомбинантные штаммы, для которых часть описанных методов не подходила, так и, что наиболее важно, из-за низкой эффективности существующих методов введения генетического материала в бациллярные клетки, 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

Целью данного исследования была разработка и применение стратегий метаболической инженерии для генетического конструирования эффективных продуцентов пуриновых соединений на основе штаммов *Bacillus, B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*.

В связи с этим 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 бацилл 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 бацилл 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 бацилл, 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 1) 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; 2) усиление процесса конверсии нуклеотидов в нуклеозиды, а также 3) активация 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 – флавинмононуклеотида, (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 эффлюкса 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→taTAat в -10 области промотора и делеция последовательности гуанинового рибопереключателя 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 *yutF*, *yitU* 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 *yutF* входит в состав оперона *yutDEF* 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 *yitU*. 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 рибопереключателя 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.

Личный вклад автора

Основные результаты исследований, изложенные в диссертации, получены автором в АО «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.

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 “IUMS 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-Пущино, 2008; 3th International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology “BioMicroWorld 2009”, Лиссабон, Португалия, 2009; XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology “IUMS 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.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из разделов: «Введение. Общая характеристика работы», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список цитируемой литературы», «Список работ, опубликованных по теме диссертации», «Список сокращений, «Благодарности».

Работа изложена на 196 страницах, включает 68 рисунков и 26 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 312 источников.

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

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Клетки *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* как фабрики для биотехнологического производства различных соединений для медицины, пищевой промышленности и сельского хозяйства

Род *Bacillus* объединяет несколько десятков видов аэробных спорообразующих грамположительных палочковидных бактерий. Представители рода *Bacillus* являются обитателями почвы; они также содержатся в воде, воздухе, растениях, пище и желудочно-кишечном тракте различных насекомых и животных. *B. subtilis* и его ближайшие родственники являются непатогенными бактериями, не синтезируют эндотоксины и другие токсичные соединения, и многие из них имеют статус безопасных организмов GRAS (Generally recognized as safe), присвоенный им Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США. Геномы, транскриптомы и основные реакции клеточного метаболизма этих бактерий хорошо изучены [*Kunst et al*., 1997; *Barbe et al.*, 2009; *Chen et al*., 2007a; *Zhang et al*., 2011a; *Nicolas et al*., 2012; *Veith et al*., 2004]. Клетки большинства штаммов этих бактерий имеют высокую скорость роста, обладают устойчивостью к неблагоприятным воздействиям и стрессовым факторам. Кроме того, многие из них активно выделяют в среду культивирования ряд экзоферментов и метаболитов. Благодаря перечисленным характеристикам, *B. subtilis, B. amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* и другие близкородственные бактерии активно используются в промышленной биотехнологии для производства ферментов (амилаз и протеиназ), рекомбинантных белков, антимикробных соединений (пептидных и липопептидных антибиотиков и бактериоцинов), адсорбентов, поверхностно-активных веществ, а также D-рибозы, витаминов (рибофлавина, фолиевой кислоты и др.), пуриновых нуклеозидов (нуклеотидов), полигаммаглутаминовых кислот и целого ряда других химических веществ, которые широко используются в промышленности, сельском хозяйстве и медицине [*Schallmey et al*., 2004; *Abriouel et al*., 2011; *Liu et al*., 2013].

Пуриновые нуклеотиды, IMP и GMP (молекулы которых состоят из азотистого (пуринового) основания, сахара рибозы и фосфатной группы (Рис. 1)), наряду с другими нуклеотидами являются важнейшими клеточными метаболитами, которые являются

структурными компонентами для синтеза ДНК и РНК, кофакторов ферментов (NAD^+ и $NADP^+$), витаминов (B1, B2 и B9) и носителей энергии (ATP и GTP), а также выполняют функции глобальных регуляторов общего метаболизма. Недостаточность пуринов и нарушение метаболизма нуклеотидов могут вызывать различные тяжелые заболевания у людей [*Comici et al.*, 2010].

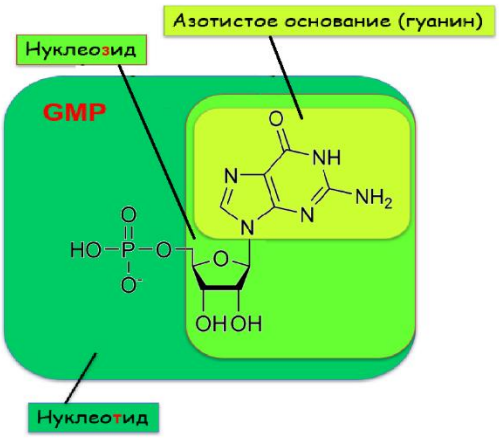


Рис. 1. Схематическое изображение пуриновых нуклеозидов и мононуклеотидов на примере GMP.

IMP, GMP, инозин и гуанозин представляют значительный интерес для прикладной биотехнологической промышленности, поскольку они широко применяются в качестве вкусовых добавок в пищевой технологии, а также в качестве лекарственных препаратов и добавок в фармацевтической промышленности. Наиболее известной вкусовой добавкой, которая используется для придания вкуса умами (*umami*) в пищевых продуктах путем обеспечения мясного и кислого вкуса, является глутамат натрия [*Jinap and Hajeb*, 2010]. IMP и GMP являются естественными факторами усиления вкуса умами, и их применяют в сочетании с глутаматом натрия для синергического усиления этого вкуса [*Kurihara and Kashiwayanagi*, 2000]. Кроме того, IMP и GMP могут служить для улучшения принятия диет с низким содержанием соли. Другие пурины, инозин, гуанозин и AICAr находят применение в фармакологии. Применение это основано на способности ряда пуриновых соединений положительно воздействовать на важные клеточные функции. Так, акадезин является эффективным средством лечения метаболического синдрома [*Luo et al.*, 2005], используется для ослабления ишемии [*Singh*, 1997], лечения ожирения и резистентности к инсулину [*Winder*, 2000; *Buhl et al.*, 2002], профилактики диабета 2 типа [*Pold et al.*, 2005], специфической индукции апоптоза в B-клетках [*Lopez et al.*, 2002]; ингибирования пролиферации раковых клеток [*Rattan et al.*, 2005]. Гуанозин и инозин обладают антиоксидантной активностью, которая может защитить клетки от активных форм

кислорода [*Gudkov et al.,* 2006], гуанозин обладает также нейротрофическим и нейритогенным действием, способствуя развитию нейронов [*Rathbone et al.,* 2008], а инозин стимулирует рост аксонов в центральной нервной системе взрослого человека, а также оказывает нейропротекторное, кардиотоническое и иммуномодулирующее действие [*Benowitz et al.,* 2002; *Haskó et al.,* 2004; *Tsuda,* 2005]. Кроме того, некоторые производные нуклеозидов являются сильнодействующими противовирусными препаратами и химиотерапевтическими агентами [*Gumina et al.,* 2001]. Метаболическое производное GMP рибофлавин (или витамин B2) относится к группе водорастворимых витаминов, служит предшественником для синтеза флавиновых коферментов, FMN и флафинадениндинуклеотида (FAD). Поскольку рибофлавин не синтезируется в клетках человека и животных, он является необходимым элементом их питания. Кроме того, рибофлавин применяется и как медицинский препарат. Препараты рибофлавина способствует восстановлению некоторых двигательных функций у пациентов с болезнью Паркинсона, а также эффективны при лечении лактоацидоза [*Coimbra and Junqueira,* 2003; *Bowers and Bert-Moreno,* 2004]. В настоящее время промышленное производство рибофлавина осуществляется без участия химического синтеза, путем культивирования (ферментации) соответствующих штаммов-продуцентов, в основном полученных на основе *B. subtilis* и *Ashbya gossypii.*

Для производства пуриновых нуклеотидов, IMP и GMP, могут быть использованы 2 способа: 1) экстракция РНК из клеток с их богатым содержанием (например, из дрожжей родов *Pichia, Saccharomyces, Hansenula*) [*Lee et al.,* 2004] с последующим разрушением и извлечением нуклеотидов и 2) производство нуклеотидов или нуклеозидов (с их последующим фосфорилированием до соответствующих нуклеотидов) микроорганизмами в процессе ферментации. Из-за ряда недостатков первого метода (например, большое количество побочных продуктов), микробный синтез приобретает все большее значение. Для ферментации используют штаммы продуцентов нуклеотидов и нуклеозидов на основе бактерий рода *Corynebacterium* [*Peifer et al.,* 2012; *Kamada et al.,* 2001], рода *Bacillus* [*Asahara et al.,* 2010; *Li et al.,* 2011; *Sheremet et al.,* 2011], *E. coli* [*Shimaoka et al.,* 2007], а также мицелиального гриба *A. gossypii* [*Ledesma-Amaro et al.,* 2015]. Однако потребность в создании улучшенных, наиболее эффективных продуцентов постоянно растет из-за роста потребности в нуклеотидах. В 2019 году мировой рынок нуклеотидов составил 501,1 млн. долларов США. Согласно отчету Grand View Research, Inc., к 2022 году он достигнет 809,3 млн. долларов США. В области производства нуклеотидов конкурируют несколько промышленных производителей, наиболее крупные из них – это Ajinomoto Co., Inc. (Япония), Takeda (Япония), CJ Cheil Jedang Co. (Южная

Корея), Inc. Daesang Co. (Южная Корея) и Star Lake Bioscience Co. (КНДР). Основными промышленными продуцентами нуклеотидов и нуклеозидов являются, соответственно, штаммы рода *Corynebacterium* и *Bacillus*.

На Рис. 2 представлены общие инженерные стратегии для увеличения производства целевого вещества в модельном организме как микробной клеточной фабрике. Большинство штаммов, полученных с помощью метаболической инженерии, используют в качестве единственного источника углерода и энергии сырье первого поколения, такое как глюкоза или сахароза. В последнее время выбор источника углерода для синтеза расширяется в пользу возобновляемых источников углерода, например, гидролизатов лигноцеллюлозного сырья. С развитием генной инженерии стало возможным оптимизировать целый ряд платформенных микроорганизмов, таких как *C. glutamicum, E. coli и B. subtilis,* для повышения производительности с точки зрения титра, продуктивности и выхода целевого продукта. Однако направленное редактирование геномов для ряда микроорганизмов – продуцентов нуклеозидов и нуклеотидов (например, *B. amyloliquefaciens*) еще остается недостаточно эффективным.

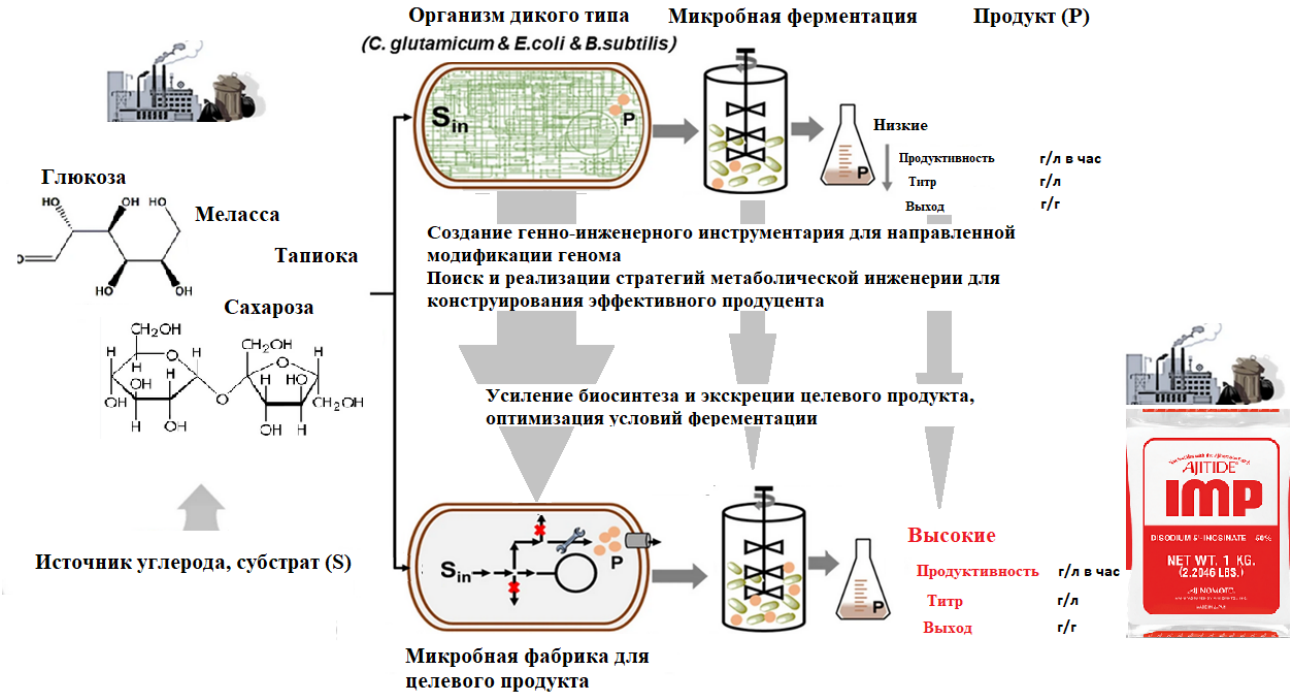


Рис. 2. Общие инженерные стратегии для увеличения производства целевого вещества в модельном организме как микробной клеточной фабрике.

Поскольку спрос на пуриновые нуклеотиды и нуклеозиды для пищевой промышленности и фармакологии постоянно растет, исследования в области создания соответствующих эффективных штаммов-продуцентов являются весьма перспективными. Следующие разделы обзора литературы посвящены созданию продуцентов нуклеозидов на основе штаммов рода *Bacillus*, а именно, методам редактирования геномов, биосинтезу

пуринов и рибофлавина, их регуляции в клетках бактерий, генетическим основам экспорта нуклеозидов и функциям микробных 5'-нуклеотидаз.

2.2. Современные подходы к конструированию штаммов бацилл

В течение длительного времени улучшение биотехнологических характеристик промышленно значимых штаммов бацилл – продуцентов пуриновых нуклеозидов достигалось традиционными методами селекции. Штаммы с мутациями, в основном направленными на усиление синтеза предшественников, отбирали с помощью мутагенеза и последующего скрининга на средах, содержащих токсичные аналоги метаболитов [*Ishii u Shiio,* 1972; *Matsui et al*., 1979; *Perkins et al*., 1999]. Однако этот подход имеет серьезные недостатки и ограничения. Он не позволяет направлено улучшать биотехнологические характеристики штаммов-продуцентов путем оптимизации существующих метаболических потоков и создания новых метаболических путей для достижения максимально эффективного превращения источника углерода в целевой продукт. Кроме того, отбор штаммов традиционными методами селекции часто приводит к накоплению вредных мутаций, которые могут вызвать нежелательные изменения в физиологии штамма-продуцента, отрицательно влиять на ростовые характеристики, снижать устойчивость к стрессовым воздействиям, возникающим в результате культивирование штаммов в ферментерах, и т. д. Избежать этих недостатков позволяет осмысленный подход к конструированию продуцентов, а именно метаболическая инженерия. Метаболическая инженерия – это улучшение клеточной активности (например, усиление синтеза целевого продукта) путем изменения ферментативных, транспортных и регуляторных функций клетки с помощью технологии рекомбинантной ДНК [*Bailey,* 1991; *Stephanopoulos,* 1999]. Этот подход основывается на изучении геномов, анализе метаболических потоков, транскрипционном анализе, изучении белковых продуктов клетки и, конечно же, требует совершенствования технологий для введения генно-инженерных модификаций в клетки.

Несмотря на то, что первые шаги по получению рекомбинантных штаммов бацилл были сделаны десятки лет назад [*Spizizen,* 1958], эти методы постоянно совершенствуются и в наше время. Однако инструменты генной инженерии, доступные для *B. subtilis* и особенно для *B. amyloliquefaciens*, все еще намного менее эффективны, чем инструменты, разработанные, например, для грамотрицательной модельной бактерии *E. coli*, в основном, из-за низкой эффективности генетической трансформации бациллярных клеток.

Долгое время использование плазмидных векторов, обеспечивающих необходимый уровень экспрессии определенных генов, было основным подходом для конструирования

промышленно значимых штаммов. Однако такие штаммы зачастую характеризовались генетической нестабильностью [*Gruss and Ehrlich,* 1989]. Кроме того, из-за законодательных ограничений одним из важных требований к промышленным рекомбинантным штаммам является отсутствие в их клетках плазмид и генов устойчивости к различным антибиотикам. Далее будут рассмотрены современные подходы к конструированию промышленно значимых штаммов *Bacillus*, преимущественно *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, которые позволяют вводить немаркированные генетические модификации непосредственно в хромосому.

2.2.1. Методы введения генетического материала в клетки штаммов бацилл

В основе любых генно-инженерных манипуляций лежит необходимость введения генетического материала в клетку. Для введения ДНК в клетки штаммов *Bacillus* может быть использован целый ряд методов, таких как, фаговая трансдукция [*Canosi et al*., 1982; *Jomantas et al*., 1991], получение протопластов с их последующей регенерацией [*Chang and Cohen*, 1979; *Vehmaanperä*, 1988], конъюгация [*Koehler and Thorne*, 1987], природная трансформация [*Spizizen*, 1958] и электротрансформация [*McDonald et al*., 1995; *Xue et al*., 1999; *Cao et al*., 2011; *Zhang et al*., 2011б; *Zhang et al*., 2011в]. Последние два метода получили наиболее широкое распространение. Хотя двухэтапная процедура использования минимальной среды для активации естественной компетентности (способности поглощать одноцепочечную ДНК) клеток *B. subtilis* впервые описанная Spizizen [1958] позволила значительно улучшить эффективность генетической трансформации *B. subtilis*, применение этого метода, как и его современных модификаций [*Rahmer et al*., 2015], ограничено, так как многие промышленно значимые штаммы *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* имеют очень низкую или полностью утратили природную компетентность. Как решение проблемы, в некоторых случаях применяют комбинацию методов трансформации и конъюгации. Сначала целевая плазмида вводится в хорошо трансформируемый штамм *B. subtilis* F-168, содержащий маркер контрселекции *mazF*, а затем она передается штамму-реципиенту *B. amyloliquefaciens* с помощью конъюгации [*Zhao et al*., 2018].

Наиболее универсальным, хорошо воспроизводимым и эффективным методом переноса генетического материала в штаммы *Bacillus*, является электротрансформация (электропорация), то есть перенос ДНК в клетки, в стенках которых под действием кратковременного электрического импульса образовались поры для проникновения ДНК. Метод впервые был применен для трансформации клеток бацилл в 1989 году [*Kusaoke et*

al., 1989; *Vehmaanperä,* 1989], однако работы по его усовершенствованию являются актуальными до сих пор. В настоящее время выявлены наиболее важные факторы, влияющие на эффективность электропорации у бацилл, а именно: размер и механизм репликации вносимых плазмид; величина напряженности электрического поля; фаза роста клеток; присутствие соединений, ослабляющих клеточную стенку (DL-треонин, глицин) и повышающих текучесть мембран (Твин 80) [*Ito and Nagane,* 2001; *McDonald et al.*, 1995; *Xue et al*., 1999; *Zhang et al*., 2011б], а также наличие в среде различных осмопротекторов, улучшающих регенерацию клеток, таких, например, как глицин-бетаин, сахароза, трегалоза, сорбит и другие [*Vehmaanperä*, 1989; *Xue et al*., 1999; *Cao et al*., 2011, *Meddeb-Mouelhi et al*., 2012]. Необходимо отметить, что эффективность введения плазмидной ДНК в клетки бацилл очень сильно зависит от работы систем рестрикции-модификации реципиентного штамма. У *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* существует насколько ферментов рестрикции, способных разрушить донорную ДНК внутри клеток (http://rebase.neb.com/rebase/). Чтобы предотвратить деградацию ДНК в процессе трансформации, ее обрабатывают соответствующими метилтрансферазами или используют генетически модифицированные штаммы-реципиенты с делетированными генами эндонуклеаз рестрикции и/или с повышенной экспрессией генов, увеличивающих способность развивать компетентность [*Waschkau et al*., 2008*; Zhang et al*., 2011б; *Chen et al*., 2016]. Некоторые из перечисленных в этом разделе данных, касающиеся передачи генетического материала в клетки бацилл, были получены в ходе настоящей работы и будут подробнее представлены в главе «Результаты и обсуждение».

Хотя для различных видов бацилл был описан целый ряд эффективных методик электротрансформации [*Ito and Nagane*, 2001; *McDonald et al*., 1995; *Xue et al*., 1999; *Cao et al*, 2011; *Zhang et al.*, 2011б; *Meddeb-Mouelhi et al*., 2012], продолжающиеся публикации на эту тему указывают на то, что по-настоящему универсальный метод по-прежнему не найден и эффективная передача генетического материала в клетки каждого конкретного вида и даже штамма требует подбора специальных условий электротрансформации.

2.2.2. Получение рекомбинантных штаммов с использованием гомологичной рекомбинации и маркеров для селекции (контрселекции)

Благодаря относительно высокой природной способности бацилл к гомологичной рекомбинации, множество известных методов конструирования штаммов основаны на использовании одиночного (при трансформации кольцевой ДНК) [*Yoshida et al*., 2000] или двойного кроссинговера (при трансформации линеаризованной ДНК) [*Fabret et al*., 2002; *Zhang et al*., 2006; *Yan et al*., 2008] (Рис. 3).

А. **Б.**

Рис. 3. Схематическое изображение гомологичной рекомбинации **А**. Пример одиночного кроссинговера (трансформация кольцевой плазмидной ДНК, происходит встраивание всей плазмиды в хромосому); **Б**. пример двойного кроссинговера (трансформация линейной ДНК, происходит замена нуклеотидной последовательности на хромосоме).

При использовании одиночного кроссинговера отбор гена устойчивости к антибиотикам, клонированного в составе плазмиды, приводит к образованию плазмидных интегрантов, что позволяет нарушать работу генов или создавать репортерные слияния. Этот подход, реализованный в серии плазмид pMUTIN [*Vagner et al.*, 1998], широко использовался в ранних исследованиях функциональной геномики *B. subtilis*. Однако метод имеет свои недостатки. Так, плазмиды, интегрированные посредством одиночного кроссинговера, могут создавать полярные эффекты, да и само событие интеграции обратимо при отсутствии селективного отбора, что приводит к генетической нестабильности.

Для внесения в определенный локус хромосомы мутаций (делеций, вставок или замен нуклеотидов), стабильных при отсутствии продолжающегося отбора, используют двойной кроссинговер. Для этого сначала получают генетическую конструкцию (ДНК-кассету), которая может быть введена в штамм-реципиент в составе не реплицирующейся плазмиды [*Zhang et al.*, 2006] или в виде линейного фрагмента ДНК [*Wu et al.*, 2019]. ДНК-кассета должна содержать фланги, достаточные для последующей гомологичной рекомбинации с соответствующими участками хромосомной ДНК (не менее 150 - 300 п н), по которым планируется встраивание этой конструкции в хромосому. В результате двойного кроссинговера расположенная на хромосоме последовательность, заключенная между фланкирующими участками, замещается на фрагмент, входящий в состав ДНК-кассеты. Для селекции рекомбинантных клонов на этапе конструирования в кассету часто клонируют обеспечивающий устойчивость к антибиотику маркерный ген,

фланкированный прямыми повторами, для его последующего вырезания с помощью гомологичной рекомбинации (Рис. 4).

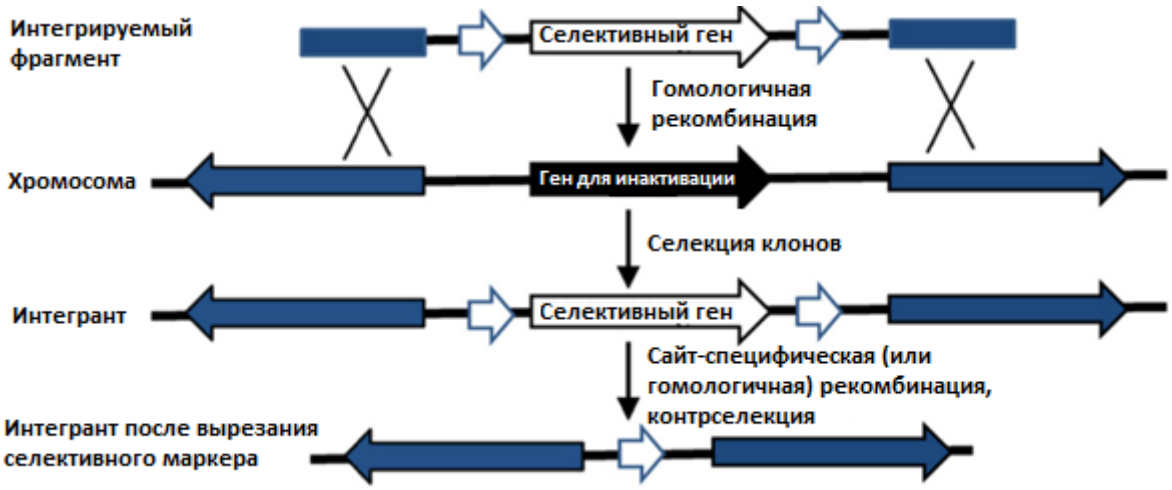


Рис. 4. Схема встраивания селективного маркера (часто это гены устойчивости к антибиотикам) с последующим его вырезанием.

Поскольку частота вырезания относительно низка, для селекции клонов, выщепивших маркерный ген, часто используют контрселекцию. Для этого дополнительно встраивают в выщепляемый участок ДНК ген, экспрессия которого приводит к гибели клеток в определенных условиях. В качестве генов для контрселекции используют, например, гены *upp* [Fabret et al., 2002], *blaI* [*Brans et al*., 2004], *mazF* [*Zhang et al*., 2006], *araR* [*Liu et al*., 2008] и другие. Как правило, контрселекция требует наличия специальных мутаций в хромосоме штамма-реципиента. Например, в случае использования в качестве маркеров для контрселекции генов *upp*, *blaI* или *araR* штаммы-реципиенты должны содержать на хромосоме, соответственно, делецию гена *upp*, замещение собственного промотора *lysA* на промотор гена β-лактамазы или вставку гена устойчивости к антибиотику, *neo*, под контролем промотора гена *ara* [*Fabret et al*., 2002; *Brans et al*., 2004; *Liu et al*., 2008].

Если удаляемый маркерный ген фланкировать специфическими последовательностями – сайтами узнавания для фермента рекомбиназы, осуществляющего сайт-специфическую рекомбинацию, то экспрессия гена этого фермента с плазмиды-помощника позволит на завершающем этапе удалить маркер устойчивости с большей эффективностью, чем это происходит в случае гомологичной рекомбинации. При этом отпадает необходимость в использовании дополнительного гена для контрселекции. Несколько таких сайт-специфических рекомбинационных систем, например, Cre/*loxP* система из бактериофага P1 и Xer (RepX/CodV)/*dif* система из

B. subtilis были успешно применены для вырезания маркерных генов при конструировании рекомбинантных штаммов *B. subtilis* [*Yan et al.*, 2008; *Bloor and Cranenburgh*, 2006].

Интересная вариация метода, базирующегося на гомологичной рекомбинации, была разработана при конструировании бесплазмидного штамма-продуцента глутамилэндопептидазы [*Yomantas et al.*, 2011]. Авторы получили множественную интеграцию кодирующего эту протеиназу гена *mpr* из *B. amyloliquefaciens* в различные локусы хромосомы *B. subtilis* благодаря необычному подходу к конструированию ДНК-кассеты для встраивания и оригинальной схеме получения и отбора рекомбинантных клонов, в которых ДНК-кассеты встроились в различные участки хромосомы (Рис. 5).

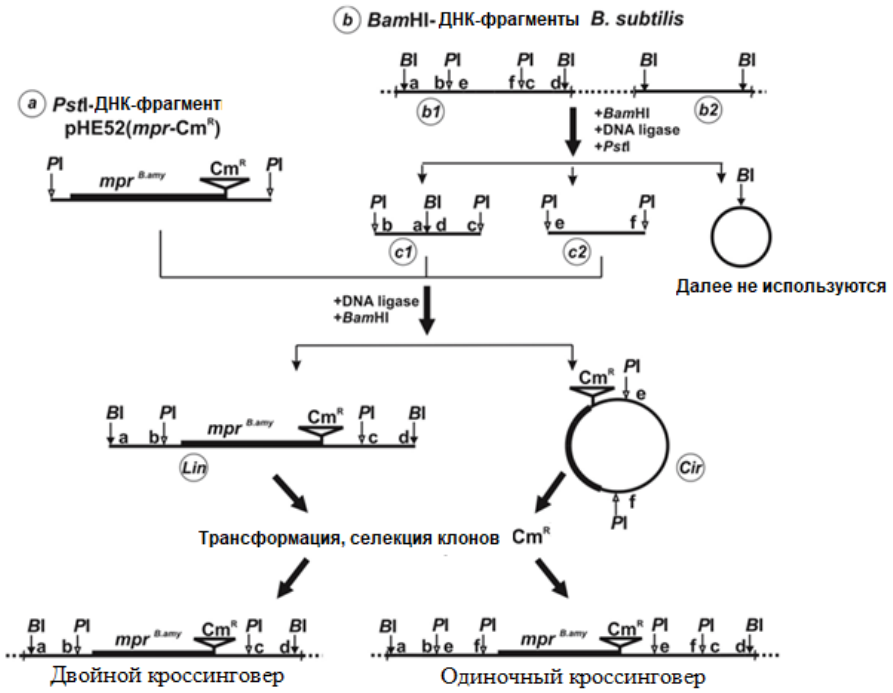


Рис. 5. Схема интеграции кассеты $mpr^{B.amy}$-Cm^R в случайные точки хромосомы *B. subtilis*. *BI, PI,* сайты рестрикции *Bam*HI и *Pst*I, соответственно (приведено по [*Yomantas et al.*, 2011]).

2.2.3. Получение рекомбинантных штаммов с использованием гетерологичных рекомбинационных систем

Несмотря на явные успехи в конструировании бесплазмидных штаммов бацилл с помощью собственной RecA-зависимой системы гомологичной рекомбинации, описанные методы являются трудозатратными и характеризуются относительно низкой частотой возникновения рекомбинантных клонов. Использование гетерологичных, более эффективных рекомбинационных систем не только для вырезания маркерных генов (как

это было описано в предыдущем разделе), но и для встраивания необходимых генетических конструкций в хромосому, позволяет существенно повысить частоту рекомбинации и облегчить отбор мутантных клонов. С этой целью могут быть использованы рекомбинационные системы транспозонов или бактериофагов. Для транспозиции в хромосому бацилл применяют производные транспозонов Tn*917* из *Enterococcus faecalis* и Tn*10* из *E. coli* [*Youngman et al*., 1983; *Petit at al*., 1990; *Steinmetz and Richter*, 1994]. Для доставки транспозонов в клетки реципиента используют термочувствительные по репликации векторы, например, pE194 и pE194ts [*Youngman et al*., 1983; *Petit at al*., 1990]. Хотя Tn*10* и Tn*917* оказались удобным инструментарием для получения набора разнообразных мутантов и изучения генетики и путей метаболизма у бацилл, однако они не подходят для адресного внесения мутаций и конструирования немаркированных штаммов-продуцентов для биотехнологии.

Кроме того, для конструирования таких штаммов на основе бацилл был адаптирован метод, основанный на использовании рекомбинационной системы Red бактериофага лямбда [*Wang et al*., 2012], ранее с успехом применявшийся для получения генетических модификаций у целого ряда других бактерий [*Datsenko and Wanner*, 2000; *Liang and Liu*, 2010]. Основываясь на опубликованном детальном исследовании механизма Red рекомбинации [*Maresca et al*., 2010], Ванг и соавторы в качестве ДНК-кассеты для инактивации генов на хромосоме предложили использовать одноцепочечную ДНК, содержащую фосфоротиоатные связи между первыми четырьмя нуклеотидами на 5'-конце и поэтому устойчивую к деградации экзонуклеазами [*Wang et al*., 2012]. Встраивание такой ДНК в хромосому происходило в результате рекомбинации по коротким гомологичным последовательностям длиной в 70 нуклеотидов с помощью β белка Red системы (Рис. 6). Селекция рекомбинантных клонов велась по устойчивости к антибиотику блеомицину. Для последующего удаления маркерного гена *ble* авторы использовали Cre/*loxP* систему. Хотя вырезание фрагментов ДНК с помощью Cre рекомбиназы происходит с высокой частотой, в качестве маркера для контрселекции на вырезаемом фрагменте был дополнительно клонирован ген *hewl*, кодирующий лизоцим. Термоиндуцибельная экспрессия этого гена приводила к лизису клеток, не выщепивших фланкированный *lox*-сайтами фрагмент, что существенно облегчало отбор немаркированных штаммов. Несмотря на несомненную эффективность и простоту метода, он все же не лишен недостатков. Так, в процессе конструирования штамма для индукции экспрессии Cre рекомбиназы и последующего удаления плазмиды-помощника из клеток требуется их длительное культивирование сначала при 42 °C, а потом при 50 °C, что может негативно влиять на свойства промышленных штаммов. Кроме того, после

вырезания маркерного гена с помощью Cre рекомбиназы в результате слияния последовательностей *lox* сайтов в хромосоме рекомбинантного штамма остаются «шрамы» – специфические последовательности длиной 69 п. н. («scar» последовательности). При получении множества мутаций количество этих последовательностей будет накапливаться, что может привести к генетической нестабильности штамма.

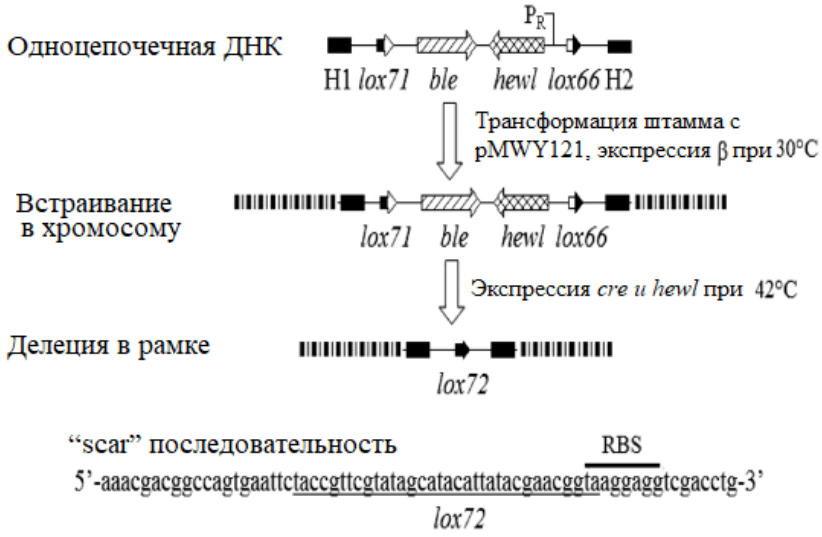


Рис. 6. Схема инактивации гена с помощью гетерологичных рекомбинационных систем (приведено по [*Wang et al*., 2012]).

2.2.4. Получение рекомбинантных штаммов с использованием технологии CRISPR/Cas

Относительно недавно был разработан и впервые применен мощный инструмент для редактирования геномов, основанный на использовании эндонуклеазы (Cas), связанной с адаптивной иммунной системой CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats), найденной у ряда бактерий. Эндонуклеаза, например, CRISPR/Cas9 типа II из *Streptococcus pyogenes*, с помощью управляющей РНК нацеливается на конкретный сайт в хромосоме, куда вносит двуцепочечный разрыв (DSB). Cas9 может успешно связываться с целевой последовательностью ДНК или расщеплять ее, только если за ней следует последовательность ДНК из 2-6 пар оснований, PAM (Protospacer Adjacent Motif). Природный Cas9 для нацеливания и внесения DSB связывается с дуплексом crRNA (CRISPR-РНК)/tracrRNA (транс-активационная РНК). В процессе создания генетического инструментария управление Cas9 было упрощено при помощи выработки единой химерной направляющей РНК, РНК-гида (gRNA). Метод редактирования генома CRISPR/Cas использует механизмы репарации DSB ДНК хозяина

для введения мутаций в последовательность ДНК. DSB могут быть восстановлены клеткой с помощью подверженных ошибкам механизмов негомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологически направленной репарации ДНК (HDR) клетки. NHEJ может вводить случайные мутации во время репарации, в то время как HDR позволяет вводить целевые, запланированные генетические модификации в присутствии сконструированной матрицы с областями гомологии хромосом, фланкирующими желаемые мутации (Рис. 7).

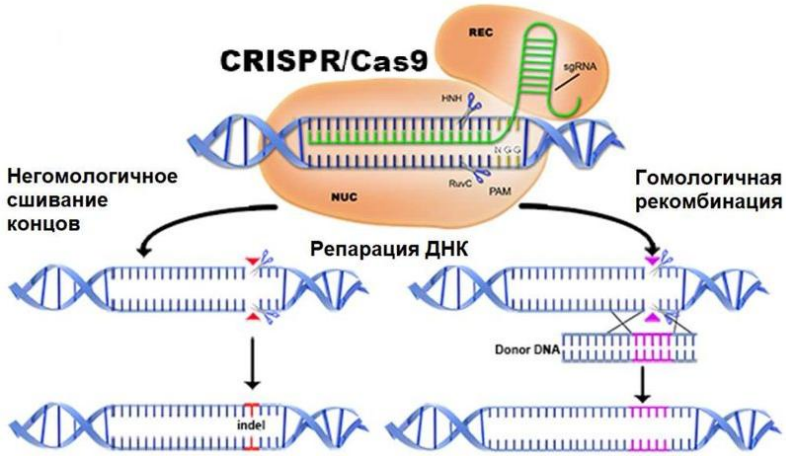


Рис. 7. Схема работы эндонуклеазы CRISPR/Cas.

В зависимости от стратегии экспрессии репарирующей ДНК, Cas9 и gRNA, системы CRISPR/Cas9 бывают трех типов: 1) одноплазмидная, 2) двухплазмидная и 3) хромосомной локализации (Рис. 8).

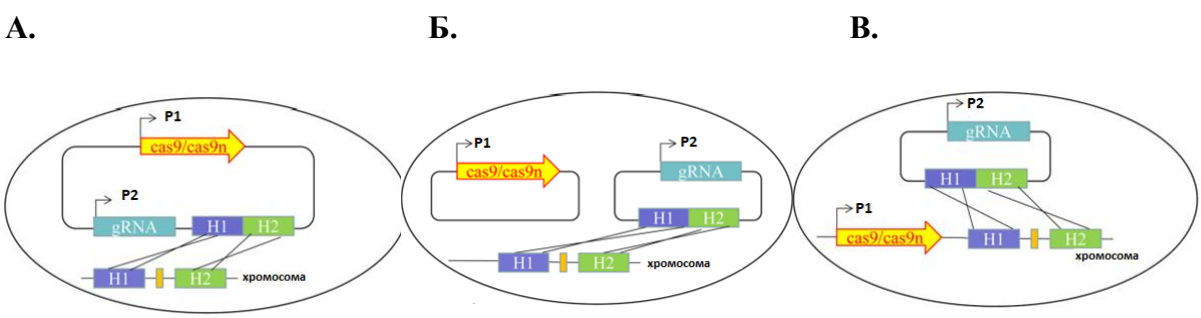


Рис. 8. Стратегии конструирования систем редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9 технологии. **А**. одноплазмидная система; **Б**. двухплазмидная система; **В**. хромосомное поддержание системы CRISPR/Cas9. P1, P2, промоторы.

С 2012 года метод CRISPR/Cas широко используется в качестве инструмента редактирования бактериальных геномов [*Jinek et al*., 2012] и позволяет введение точечных мутаций, любых делеций, вставок ДНК, например, для сверхэкспрессии генов или

создания эпитопных или флуоресцентных белковых меток. Применение CRISPR/Cas9 редактирования сократило время на введение генетических модификаций и во многом преодолело ограничения предыдущих методов.

Внедрение этой системы не только устранило необходимость использования маркеров селекции для редактирования генома, но также значительно увеличило эффективность и множественность редактирования. Однако из-за большого количества уже имеющихся хорошо зарекомендовавших себя инструментов модификации генома бацилл внедрение CRISPR/Cas9 для редактирования геномов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* было относительно медленным. Только в последние годы появилось несколько публикаций, показывающих развитие системы CRISPR/Cas9 для этих бактерий [*Altenbuchner*, 2016; *Zhang et al*., 2016; *Zhao et al*., 2020; *Qiu et al*., 2020]. Авторы продемонстрировали использование каталитически активного Cas9 для делеций генома, малых и больших вставок ДНК, а также множественных делеций. Однако DSB, индуцируемые CRISPR/Cas9, приводят к низкой выживаемости клеток, что значительно снижает эффективность редактирования генома. Поэтому было предложено использовать каталитически инактивированный «dead» Cas9 (dCas9). Нацеливание неактивной нуклеазы dCas9 на определенные области генов позволило направленно репрессировать гены *B. subtilis* (CRISPRi) [*Peters et al*., 2016]. Дальнейшее использование полностью или частично лишенного нуклеазной активности Cas9 (dCas9 и nCas9, соответственно) в комбинации с индуцибельной цитидиндезаминазой позволило получать нуклеотидные замены (C на T) или инактивацию целевого гена (путем формирования стоп-кодона трансляции). Применение неактивных эндонуклеаз привело к снижению гибели клеток реципиентного штамма в отсутствии образования двуцепочечных разрывов и способствовало росту эффективности введения нуклеотидных замен [*Yu et al*., 2020; *Qiu et al.*, 2020]. Так, частоты одновременного введения мутаций в четырех целевых генах хромосом *B. subtilis* [*Yu et al*., 2020] и трех генах *B. amyloliquefaciens* [*Xin et al*., 2022] составили порядка 50%.

Необходимо подчеркнуть, что большинство перечисленных выше методов генной инженерии бацилл имеют ограничения по их использованию для конструирования многих промышленных штаммов. Для улучшения свойств штаммов, синтезирующих продукты для пищевой промышленности и медицины, необходимо применять технику «self-cloning», то есть использовать в ходе генетического конструирования только собственные нуклеотидные последовательности штамма-продуцента. Однако, как уже отмечалось выше, вырезание маркерных генов с помощью Cre/*loxP* системы оставляет на хромосоме гетерологичную последовательность, а применение большинства маркерных генов для

контрселекции предполагает использование специальных реципиентных штаммов с определенными мутациями на хромосоме, что может быть неприемлемо при получении продуцентов с заданными свойствами. Кроме того, использование контрселекции, которая является необходимой в ряде описанных выше методов, нежелательно и затратно по времени для конструирования промышленных продуцентов, так как требует предварительных специальных генных модификаций штаммов.

Несмотря на то, что CRISPR/Cas технологии способны избавить от недостатков, перечисленных в предыдущем абзаце, их использование также не является универсальным. Как и в других системах, эффективность гомологичной рекомбинации сильно зависит от протяженности гомологичного участка репарирующей ДНК. Известно также, что нецелевые эффекты (off-target effects, незапланированные модификации хромосомы) – являются важным недостатком CRISPR/Cas технологии редактирования генома. Целевой охват – еще одна важная проблема для CRISPR/Cas технологии, поскольку возможность генетических модификаций хотя и достаточно велика, но все же ограничена наличием PAM-последовательности на определенном расстоянии от целевого участка хромосомы. Дальнейшее совершенствование гибкости и универсальности CRISPR/Cas технологии возможно путем использования различных вариантов Cas9, а также других CRISPR нуклеаз, таких, например, как недавно описанные варианты MAD7 и dMAD7 [*Price et al*., 2020].

Необходимо также отметить, что метод CRISPR/Cas требует многоэтапного конструирования плазмид, что значительно снижает внутреннюю эффективность системы. Поэтому применение редактирования с помощью CRISPR/Cas позволяет сократить время на отбор рекомбинантных штаммов только в случае необходимости одновременного введения нескольких хромосомных модификаций, а разработанные к настоящему моменту наиболее эффективные вариации метода для штаммов *Bacillus* позволяют проводить только ограниченные типы генетических модификаций (нуклеотидные замены).

Есть и еще один, пожалуй, наиболее важный аспект. Вне зависимости от метода конструирование рекомбинантных штаммов бацилл предполагает отбор клонов, в которых одновременно произошли два события: проникновение генетического материала в клетку и целевая модификация хромосомы. Поскольку отбор таких клонов требует высокой эффективности трансформации, все рассмотренные выше методы применяются для конструирования обладающих природной компетентностью и хорошо трансформируемых штаммов бацилл, в основном *B. subtilis*. Однако многие промышленно значимые штаммы на основе *B. subtilis, B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis* в ходе селекции утратили эти свойства [*Cao et al*., 2011; *Zhang et al*., 2011б; *Waschkau et al*.,

2008]. Следовательно, использование описанных выше методов в работе с ними сильно затруднено. Так, например, редактирование с помощью CRISPR/Cas9 включает как минимум два одновременных события рекомбинации (интеграцию gRNA и редактирующей ДНК), поэтому эффективность введения в клетку генетического материала (трансформация) становится критическим фактором. Проблема получения генетических модификаций в хромосомах плохо трансформируемых бактерий может быть разрешена при помощи разделения этапов трансформации, встраивания плазмидной ДНК в хромосому и последующего ее вырезания. Этого можно достичь, используя термочувствительные по репликации векторы. Такой метод был разработан и применен для конструирования штаммов бацилл в ходе настоящей работы, его подробное описание будет представлено в главе «Результаты и обсуждение».

2.3. Биосинтез пуриновых нуклеотидов у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*

Пуриновые нуклеотиды синтезируются в клетках бацилл и других микроорганизмов двумя способами, 1) в пути биосинтеза *de novo* из PRPP и глютамина и 2) в *salvage* пути, который служит для взаимопревращения пуринов, а также их усвоения из среды культивирования, и в котором, при участии PRPP пуриновые основания могут быть преобразованы в соответствующие нуклеотиды.

Предшественник биосинтеза пуринов, PRPP. Биосинтез PRPP (из рибозо-5-фосфата (R5P) и ATP путем переноса β, γ-дифосфорильного фрагмента ATP на C1-гидроксигруппу R5P) осуществляет продукт гена *prs,* фермент фосфорибозилпирофосфатсинтетаза (PRS; EC 2.7.6.1). Помимо *de novo* и *salvage* путей биосинтеза пуриновых соединений PRPP участвует в синтезе пиримидиновых нуклеотидов, аминокислот гистидина и триптофана, кофакторов NAD^+ и $NADP^+$ [*Hove-Jensen et al*., 2016]. Являясь центральным ферментом в метаболизме азотсодержащих соединений, PRS высоко консервативен среди различных организмов и его активность в клетках подвержена строгой регуляции. Были описаны три класса PRS, которые различаются по зависимости их активности от фосфат-ионов, по механизмам аллостерической регуляции и специфичности дифосфорильных доноров [*Arnvig et al*., 1990; *Fox and Kelley*, 1971; *Gibson et al*., 1982; *Hove-Jensen et al*., 1986; *Kadziola et al*., 2005; *Krath and Hove-Jensen*, 2001; *Switzer and Sogin*, 1973]. PRS класса I являются одними из наиболее изученных и наиболее распространенных у бактерий и млекопитающих. Выравнивание аминокислотных последовательностей различных организмов выявило высокое сходство среди PRPP-синтетаз (Рис. 9).

PRS класса I требуют для стабилизации и активации присутствия Mg^{2+} и неорганического фосфата (Pi). Mg^{2+} образует комплекс с ATP (Mg-ATP), который является фактическим субстратом фермента. Другие двухвалентные катионы, такие как Mn^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+} или Cd^{2+}, могут служить заменителями Mg^{2+}, правда, с относительно более низкой активностью. Фосфат (Pi) оказывает множественное влияние на активность и структуру фермента. Он действует как активатор активности PRS у бактерий и млекопитающих. Известно также, что SO_4^{2-} может имитировать действие фосфата в концентрациях, в 10 раз превышающих Pi. Pi или SO_4^{2-} конкурируют за свою функцию с ингибитором ADP (аденозин-5'-дифосфатом) в одном и том же аллостерическом сайте. Интересно, что при высоких концентрациях как Pi, так и SO_4^{2-} могут оказывать ингибирующее действие из-за их конкурентного связывания в сайте связывания R5P [*Eriksen et al*., 2000; *Li et al*., 2007]. Конформационные различия между PRS из *B. subtilis* (PRS_{Bs}) и PRS1 касаются связывания белком PRS1 дополнительных ионов SO_4^{2-}. Помимо связывания в сайте для R5P и аллостерическом сайте, как показано для PRS_{Bs}, дополнительный ион SO_4^{2-} связывается с новым аллостерическим сайтом на границе димера PRS1 [*Li et al*., 2007].

Ферменты PRS класса I чувствительны к ретроингибированию пуриновыми нуклеотидами, ADP и GDP (гуанозин-5'-дифосфатом) [*Arnvig et al*., 1990; *Gibson et al*., 1982; *Hove-Jensen et al*., 1986; *Switzer and Sogin*, 1973]. ADP является наиболее мощным ингибитором, выступающим, в зависимости от наличия и концентрации субстратов, в роли как конкурентного, так и аллостерического ингибитора. Конкурентное ингибирование ADP обусловлено его связыванием в сайте для ATP, а аллостерическое ингибирование проявляется в результате его конкурентного связывания с Pi в аллостерическом сайте. В некоторых случаях GDP также является ингибитором, хотя GDP связывается только с аллостерическим сайтом.

К моменту исследований по теме данной работы были опубликованы кристаллические структуры PRS_{Bs} и PRS1 [*Eriksen et al*., 2000; *Eriksen et al*., 2002; *Li et al*., 2007]. Идентичность аминокислотных последовательностей между PRS_{Bs} и PRS1 составляет 47%, и структуры белков очень похожи (Рис. 10).

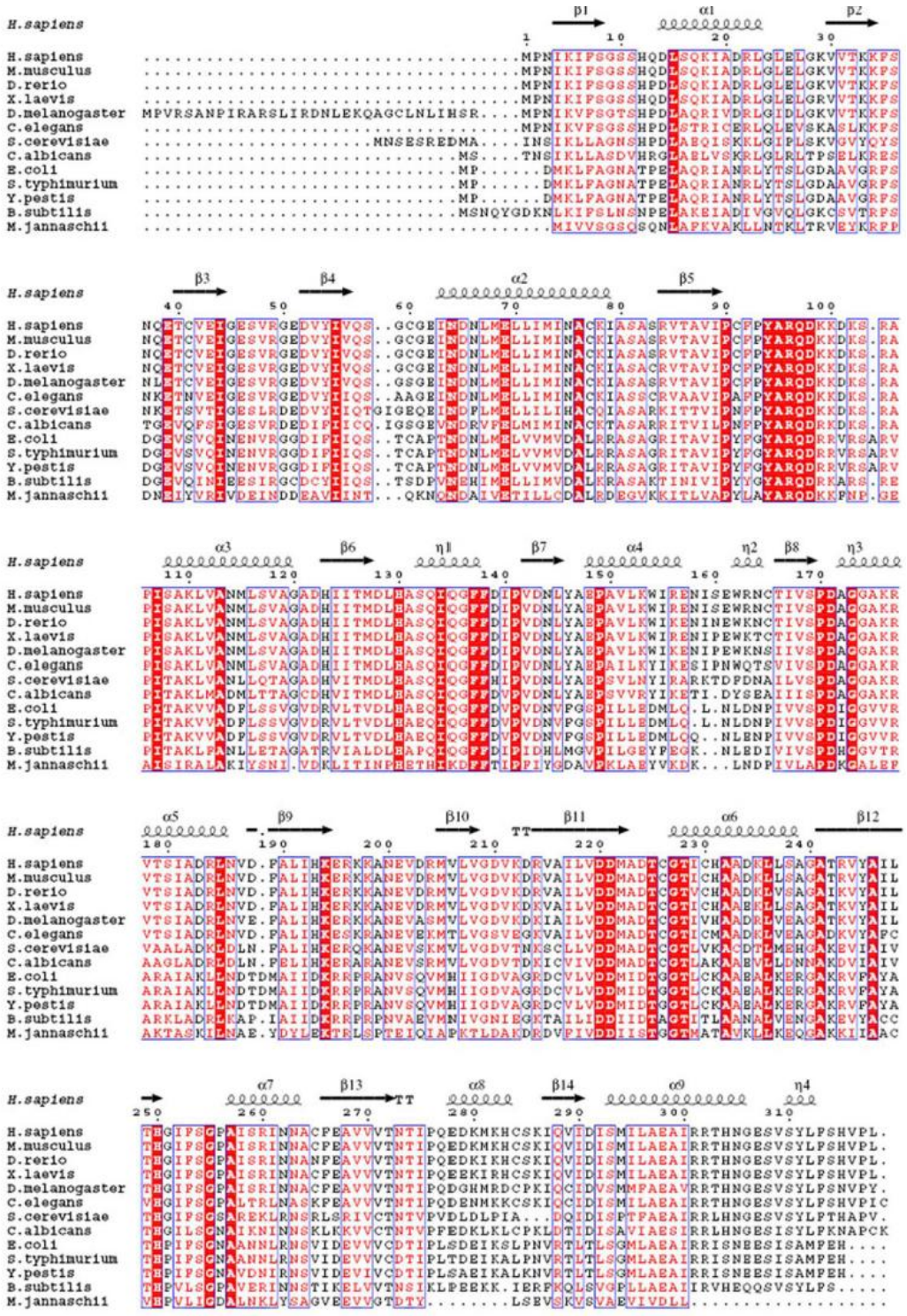


Рис. 9. Сравнение последовательности изофермента I PRS человека (*Homo sapiens*) с другими PRS разных видов. Строго консервативные остатки выделены красными прямоугольниками, а консервативные остатки – красными буквами в синем контуре. Элементы вторичной структуры PRS1 показаны над выравниванием. Обозначения: M. musculus: *Mus musculus*; D. rerio: *Danio rerio*; X. laevis: *Xenopus laevis*; D. melanogaster: *Drosophila melanogaster*; C. elegans: *Caenorhabditis elegans*; S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*; C. albicans: *Candida albicans*; E. coli: *Escherichia coli*; S. typhimurium: *Salmonella typhimurium*; Y. pestis: *Yersinia pestis*; B. subtilis: *Bacillus subtilis*; M. jannaschii: *Methanocaldococcus jannaschii* (приведено по [*Li et al*., 2007]).

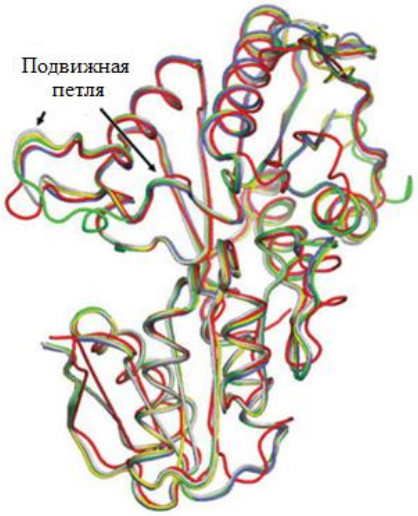


Рис. 10. Наложение 3D структур белков PRS1 и PRS_{Bs}. Структура $PRS1 \cdot SO_4^{2-}$ показана красным, структура $PRS_{Bs} \cdot SO_4^{2-}$ (номер в базе данных белков PDB (Protein Data Base): 1DKR) с закрытой конформацией – зеленым, с открытой – синим; структура $PRS_{Bs} \cdot mATP \cdot SO_4^{2-} \cdot Cd^{2+}$ (PDB:1IBS) желтым цветом, а структура $PRS_{Bs} \cdot mADP$ (PDB:1DKU) – белым. mATP - α, β-метилен-ATP; mADP- α, β-метилен-ADP (приведено по [*Li et al*., 2007]).

Свойства фермента PRS из *B. amyloliquefaciens*, изученные в ходе данной работы, будут изложены в разделе 4.2.2 главы «Результаты и обсуждение».

Биосинтез пуринов *de novo* подробно описан в ряде обзоров [*Zalkin*, 1993*; Zhang et al*., 2008] и начинается с молекулы PRPP (Рис. 11).

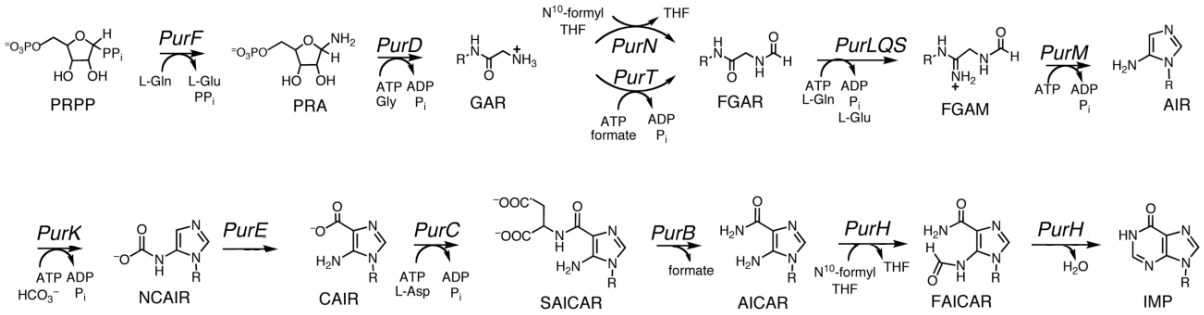


Рис. 11. Схема пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* у *B. subtilis* (на основе *Zhang et al*., 2008; https://biocyc.org). Соединения: **R**, R5P; **PRPP,** 5-фосфорибозил-1-пирофосфат; **PRA**, 5-фосфорибозиламин; **GAR**, 5-фосфорибозилглицинамид; **FGAR**, 5'-фосфорибозил-N-формилглицинамид; **FGAM**, 5'-фосфорибозил-N-формилглицинамидин; **AIR**, 5'-фосфорибозил-5-аминоимидазол; **NCAIR**, 5'-фосфорибозил-5-карбоксиаминоимидазол; **CAIR**, 5'-фосфорибозил-4-карбокси-5-аминоимидазол; **SAICAR**, 5'-фосфорибозил-4-(N-сукцинокарбоксамид)-5-аминоимидазол; **AICAR**, 5'-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоксамид; **FAICAR**, 5'-фосфорибозил-5-формил-4-аминоимидазолкарбоксамид; **IMP**, инозин-5'-монофосфат; **N^{10}-formyl-TNF**, N^{10}-формил-H_4-фолат. Ферменты: **PurF,** глутамин-PRPP-амидотрансфераза; **PurD,** GAR-синтетаза; **PurN,** GAR-формилтрансфераза; **PurT,** FGAR-синтетаза; **PurLQS,** FGAM-синтетаза II; **PurM,** AIR-синтетаза; **PurE**, NCAIR-мутаза; **PurK,** NCAIR-синтетаза; **PurC**, SAICAR-синтетаза; **PurB**, аденилсукцинатлиаза; **PurH**, AICAR-формилтрансфераза / IMP-циклогидролаза.

В ходе 11 последовательных реакций на остатке R5P с использованием различных групп постепенно формируется пуриновое кольцо. В качестве «строительного материала» используются два атома углерода и аминогруппа глицина, атомы углерода двух молекул N^{10}-формил-H_4-фолата, три одноуглеродных фрагмента HCO_3^-, две амидные группы глутамина и одна аминогруппа аспартата (Рис. 12).

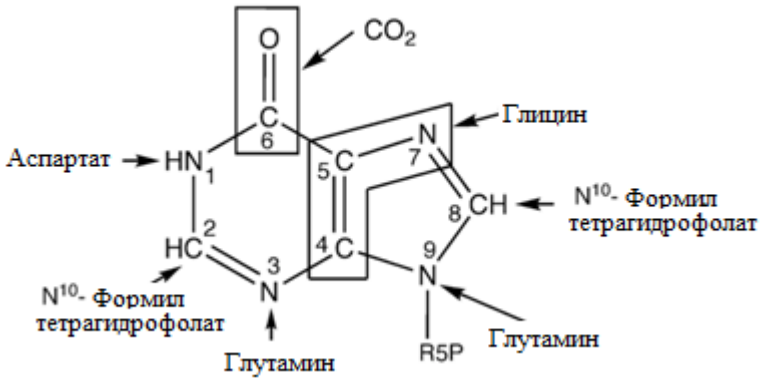


Рис. 12. Происхождение атомов в молекуле IMP (приведено по [*Zhang et al*., 2008]).

IMP в ходе двух последовательных реакций может быть преобразован в AMP или GMP (Рис. 13). Эти реакции катализируются, соответственно, ферментами sAMP синтетазой (*purA*) и sAMP лиазой (*purB*) или IMP дегидрогеназой (*guaB*) и GMP синтазой (*guaA*) (Рис. 13). Превращение IMP в AMP и GMP относят к *salvage* пути (путь сбережения или спасения), который обеспечивает как утилизацию поступающих извне, так и реутилизацию внутриклеточных пуринов, создает необходимое разнообразие и поддерживает баланс пуриновых соединений в клетке. Благодаря *salvage* пути свободные пуриновые основания могут включаться в состав нуклеотидов (Рис. 13). Основные ферменты *salvage* пути – это аденин/гипоксантин/ксантин/гуанин фосфорибозилтрансферазы (продукты генов *apt, hprT, xpt*), которые в присутствии PRPP осуществляют превращение свободных пуриновых оснований в нуклеотиды. Кроме того, в *salvage* пути и пути деградации пуринов, участвуют также дезаминазы, оксидазы, фосфорилазы, киназы и т.д. (Рис. 13). Так, GMP редуктаза (продукт *guaC*) трансформирует GMP в IMP; различные ферменты с 5′-нуклеотидазной активностью осуществляют превращение GMP, XMP, IMP и AMP в, соответственно, гуанозин, ксантин, инозин и аденозин; киназы катализируют обратную реакцию; а пурин нуклеозид фосфорилазы (продукты *deoD* и *pupG (*ранее *punA*) обратимо расщепляют нуклеозиды на соответствующие азотистые основания и рибозо-1-фосфат.

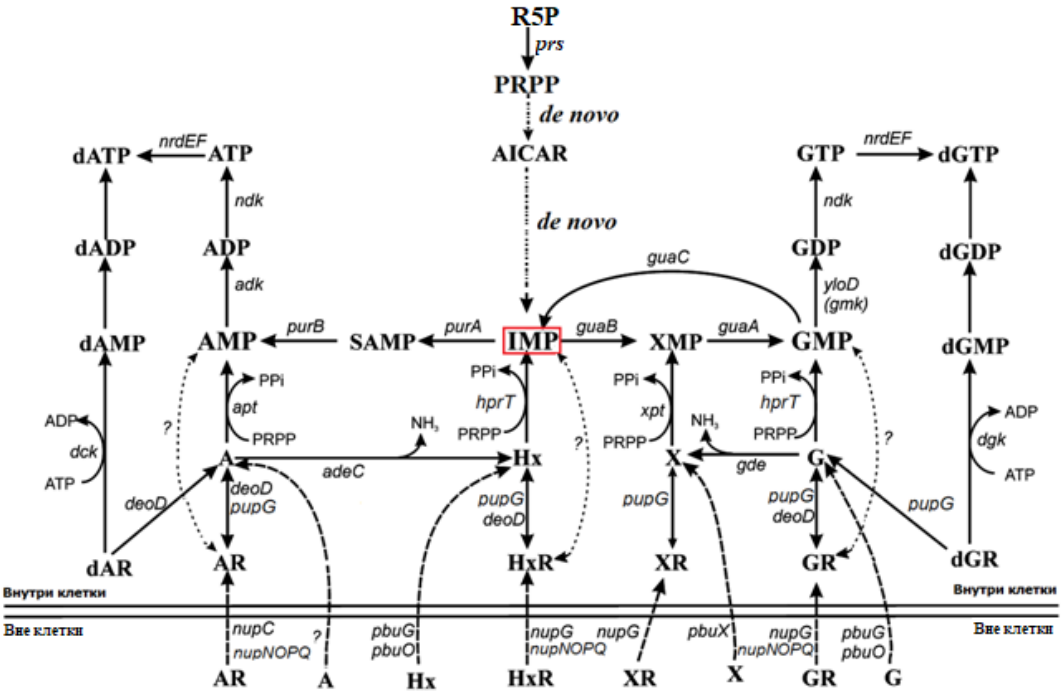


Рис. 13. Упрощенная схема синтеза *de novo*, взаимопревращения (*salvage*) и транспорта внутрь пуриновых соединений у бацилл. Соединения: **R5P**, рибозо-5-фосфат; **IMP**, инозин-5'-монофосфат; **XMP**, ксантозин-5'-монофосфат; **GMP**, гуанозин-5'-монофосфат; **G**, гуанин; **GR**, гуанозин; **dGR**, 2'-дезоксигуанозин; **SAMP**, сукциниладенозин-5'-монофосфат; **AMP**, аденозин-5'-монофосфат; **A**, аденин; **dAR**, 2'-дезоксиаденозин; **AR**, аденозин; **Hx**, гипоксантин; **HxR**, инозин; **dHxR**, 2'-дезоксиинозин; **X**, ксантин; **XR**, ксантозин; **GDP**, гуанозин-5'-дифосфат; **GTP**, гуанозин-5'-трифосфат; **ADP**, аденозин-5'-дифосфат; **ATP**, аденозин-5'-трифосфат. Гены, кодирующие ферменты: ***prs***, PRPP-синтетаза; ***guaB***, IMP-дегидрогеназа; ***guaA***, GMP-синтетаза; ***purA***, аденилсукцинатсинтетаза; ***purB***, аденилсукцинатлиаза; ***guaC***, GMP-редуктаза; ***hprT***, гипоксантин(гуанин)фосфорибозилтрансфераза; ***xpt***, ксантинфосфорибозилтрансфераза; ***apt***, аденинфосфорибозилтрансфераза; ***adeC***, адениндеаминаза; ***pucABCDE***, ксантиндегидрогеназа; ***gde*** (*guaD*), гуаниндезаминаза; ***deoD***, пуриннуклеозидфосфорилаза; ***pupG***, пуриннуклеозидфосфорилаза; ***gmk***, гуанилаткиназа; ***ndk***, нуклеозиддифосфаткиназа; ***adk***, аденилаткиназа; ***dck***, дезоксиаденозин/дезоксицитидинкиназа; ***dgk***, дезоксигуанозинкиназа; ***nrdEF***, рибонуклеозид-дифосфатредуктаза; ***nupC***, транспортер пиримидиновых нуклеозидов и аденозина (CNT семейство); ***nupG*** **(**или ***punA*****)**, транспортер пуриновых нуклеозидов (NHS семейство); ***nupN***, транспортер гуанозина (семейство ABC); ***pbuX***, транспортер ксантина; ***pbuG*** и ***pbuO***, транспортеры гипоксантина и гуанина; **?**, неизвестные 5'-нуклеотидазы.

2.4. Биосинтез рибофлавина и его производных, FMN и FAD, у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*

Основные реакции пути биосинтеза рибофлавина (7,8-диметил-10- (1'-D-рибитил) изоаллоксазина) и производных флавинов, FMN и FAD, достаточно хорошо изучены у бактерий, архей, грибов и растений и описаны в ряде обзоров [*Abbas and Sibirny*, 2011; *Fischer and Bacher*, 2005; *Liu et al*., 2020; *Averianova et al*., 2020]. Большинство ферментов,

участвующих в пути биосинтеза рибофлавина, в основном схожи у прокариот и растений, тогда как у грибов есть некоторые отличия [*Abbas and Sibirny*, 2011]. В качестве источника углерода для производства рибофлавина продуцентами на основе *B. subtilis* или *A. gossypii* используется глюкоза или жирные кислоты, соответственно.

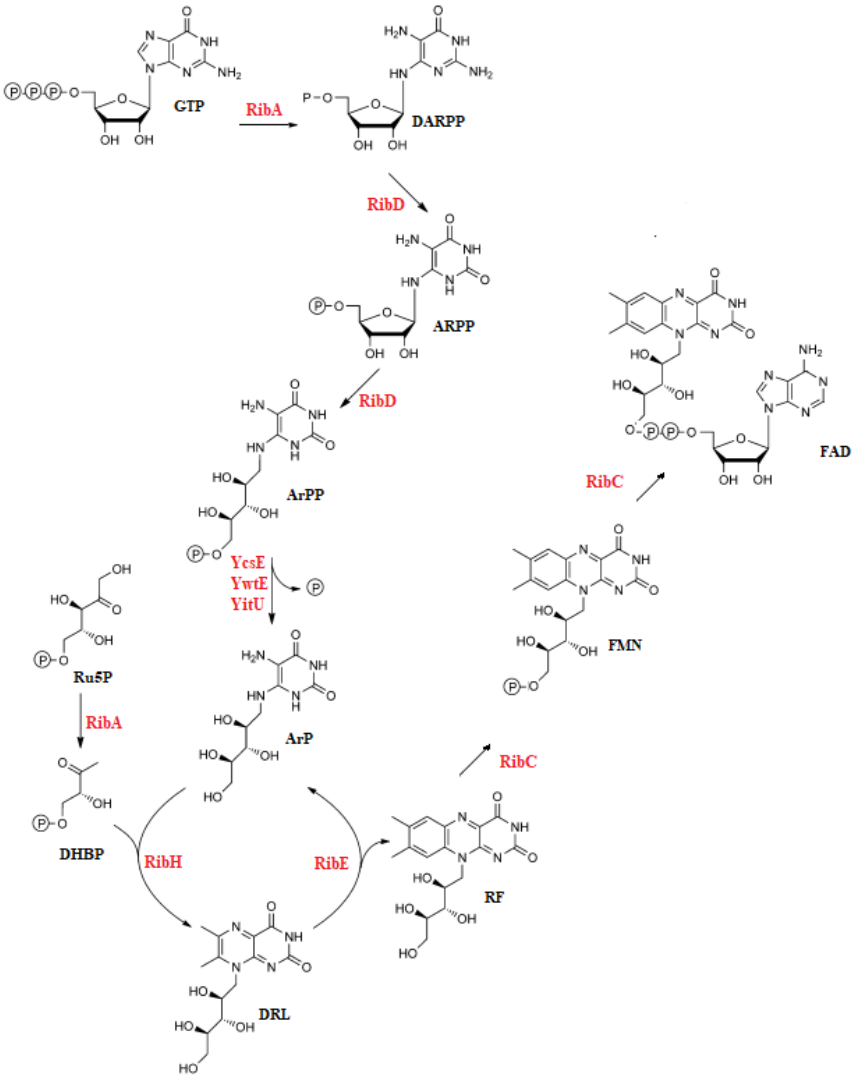


Рис. 14. Биосинтез рибофлавина, FMN и FAD у бацилл. Соединения: **DARPP**, 2,5-диамино-6-рибозиламино-4 (3H) -пиримидиндион фосфат; **ARPP**, 5-амино-6-(рибозиламино)-2,4-(1H, 3H)-пиримидиндион-5'-фосфат; **ArPP**, 5-амино-6-рибитиламино-2,4-(1H, 3H)-пиримидиндион-5'-фосфат; **ArP**, 5-амино-6-рибитиламино-2,4-(1H, 3H) -пиримидиндион; **DHBP**, 3,4-дигидрокси-2-бутанон 4-фосфат; **DRL**, 6,7-диметил-8-рибитил-люмазин; **P**, фосфорильная группа. Ферменты: **RibA**, бифункциональный фермент GTP-циклогидролаза II (EC 3.5.4.25)/ 3,4-дигидрокси-2-бутанон 4-фосфат (DHBP)-синтаза (EC 4.1.99.12); **RibD**, бифункциональный фермент диаминогидроксифосфорибозиламинопиримидин (DARPP)-дезаминаза (EC 3.5.4.26) / 5-амино-6-(5-фосфорибозиламино) урацил (ARPP)-редуктаза (EC 1.1.1.193); **RibH**, 6,7-диметил-8-рибитиллумазин (DRL)-синтаза (EC 2.5.1.78); **RibE**, рибофлавин-синтаза (EC 2.5.1.9); **RibC**, бифункциональная рибофлавин-киназа (EC 2.7.1.26) / FAD-синтаза (EC 2.7.7.2); **YcsE**, **YwtE**, **YitU**, 5'-нуклеотидазы (EC 3.1.3.104).

Биосинтез рибофлавина у бацилл начинается с GTP и рибулозо-5-фосфата (Ru5P) и протекает с образованием промежуточных соединений, пиримидинов и птеридинов (Рис. 14). Образующийся рибофлавин с помощью бифункциональной флавокиназы / FAD-синтазы, кодируемой геном *ribC*, далее превращается во флавиновые кофакторы, FMN и FAD, которые участвуют в различных окислительно-восстановительных реакциях клетки.

Несмотря на то, что практически все этапы этого важного биосинтетического пути были хорошо изучены, механизм дефосфорилирования 5-амино-6-рибитиламино-2,4-(1H, 3H)-пиримидиндион-5'-фосфата (ArPP), а также фермент, катализирующий это превращение, долгое время оставались неизвестны. В 2015 году у *B. subtilis* был найден ген *ycsE,* продукт которого принадлежит суперсемейству HAD (Haloacid Dehalogenase Superfamily, HADSF), подсемейству IIB Cof и осуществляет дефосфорилирование ArPP, а также FMN [*Sarge et al*., 2015]. Авторы показали, что продукты генов *ywtE* и *yitU*, принадлежащие к тому же семейству, также способны к гидролизу ArPP, но в меньшей степени. Практически в это же время в ходе представленных в этой диссертационной работе исследований был идентифицирован ген *yitU*, а его продукт был подробно охарактеризован как 5'-нуклеотидаза, способная наряду с ArPP гидролизовать целый ряд нуклеотидов, отдавая предпочтение FMN. Эти данные представлены в разделе 4.2.3 главы «Результаты и обсуждение».

2.5. Генетический контроль и регуляция метаболизма пуриновых нуклеотидов и рибофлавина у бацилл

2.5.1. Пуриновые нуклеотиды

Пуриновые нуклеотиды участвуют во многих важных процессах, таких как синтез нуклеиновых кислот, макроэргов, кофакторов, витаминов, а также ряда аминокислот, играя, таким образом, ключевую роль в физиологии клетки. В свою очередь, для биосинтеза пуринов необходимо наличие в клетке целого ряда субстратов. Поэтому для регуляции пуринового обмена очень важны конкурентные взаимодействия между ферментными системами биосинтеза предшественников, а также системами, использующими пурины в качестве исходных субстратов. Так, например, PRPP помимо биосинтеза пуриновых нуклеотидов является предшественником для биосинтеза пиримидиновых и пиридиновых нуклеотидов и триптофана, и соответствующие метаболические пути влияют на регуляцию биосинтеза пуринов. Существуют также и неочевидные взаимодействия. Так, недавно была обнаружена связь между гомеостазом GTP и метаболизмом метионина, которая может быть ключом для адаптации к изменениям окружающей среды [*Osaka et al*., 2020].

Пул внутриклеточных пуриновых производных должен поддерживаться на определенном уровне, поэтому путь биосинтеза пуринов *de novo*, а также их транспорт и взаимопревращение строго регулируются. Эта регуляция неплохо изучена у бацилл и является очень многоплановой и сложной. Она осуществляется как на уровне активности целого ряда ферментов, так и на уровне экспрессии соответствующих генов (Рис. 15). Рассмотрим эти механизмы подробнее.

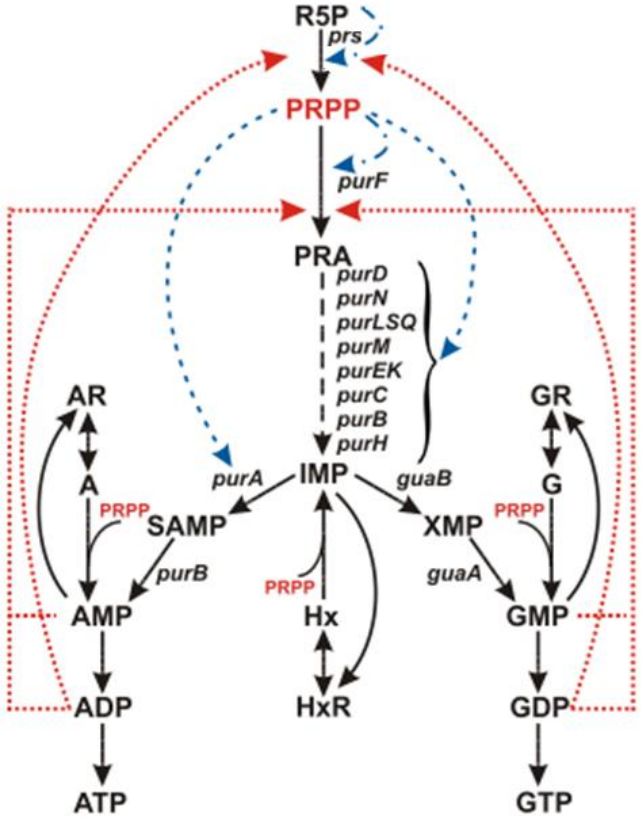


Рис. 15. Упрощенная схема биосинтетических путей пуриновых нуклеотидов у *B. subtilis* (*de novo* и *salvage* пути). Синие пунктирные линии изображают позитивную регуляцию экспрессии генов, синяя штрихпунктирная линия изображает активацию фермента, а красные пунктирные линии обозначают ингибирование ферментов. Обозначения: **R5P**, рибозо-5-фосфат; **PRPP**, 5-фосфо-α-D-рибозил-1-пирофосфат; **PRA**, 5-фосфо-α-D-рибозиламин; **IMP**, инозин 5'-монофосфат; **Hx**, гипоксантин; **HxR**, инозин; **XMP**, ксантозин 5'-монофосфат; **GMP**, гуанозин 5'-монофосфат; **GDP**, гуанозин 5'-дифосфат; **GTP**, гуанозин 5'-трифосфат; **G**, гуанин, **GR**, гуанозин **SAMP**, сукциниладенозин-5'-монофосфат; **AMP**, аденозин-5'-монофосфат; **ADP**, аденозин-5'-дифосфат; **ADP**, аденозин 5'-трифосфат, **A**, аденин; **AR**, аденозин.

2.5.1.1. Регуляция на уровне транскрипции генов

У *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* все гены биосинтеза IMP *de novo* входят в состав оперона *purEKBCSQLFMNHD* [*Ebbole and Zalkin*, 1987]. Гены взаимопревращения и

деградации пуринов, включая ген для синтеза AMP (*purA*) и два гена для синтеза GMP (*guaA* и *guaB*), расположены на хромосоме отдельно.

На уровне экспрессии большинство генов, участвующих в транспорте и синтезе пуринов у *Bacillus*, регулируются двумя разными механизмами, 1) репрессией транскрипции с помощью белка-репрессора PurR [*Zalkin*, 1993] и 2) преждевременной терминацией транскрипции с участием рибопереключателя [*Johansen et al.*, 2003].

PurR репрессия. Репрессор PurR регулирует не только транскрипцию оперона *pur*, кодирующего ферменты синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*, но также и транскрипцию *purR-yabJ* оперона, и ряда других генов и оперонов, составляющих PurR регулон (Рис. 16). Гены *purR* и *yabJ* очевидно связаны трансляционно, так как содержат четыре перекрывающихся нуклеотида. Изначально предполагалось, что продукт *yabJ* также участвует в репрессии PurR регулона [*Saxild et al.*, 2001], однако позже было установлено, что функция ортологичного белка RidA из *Salmonella enterica* – другая, и заключается в ускорении высвобождения аммиака из промежуточных продуктов енамина/имина, генерируемых PLP-зависимыми дегидратазами [*Lambrecht et al.*, 2012].

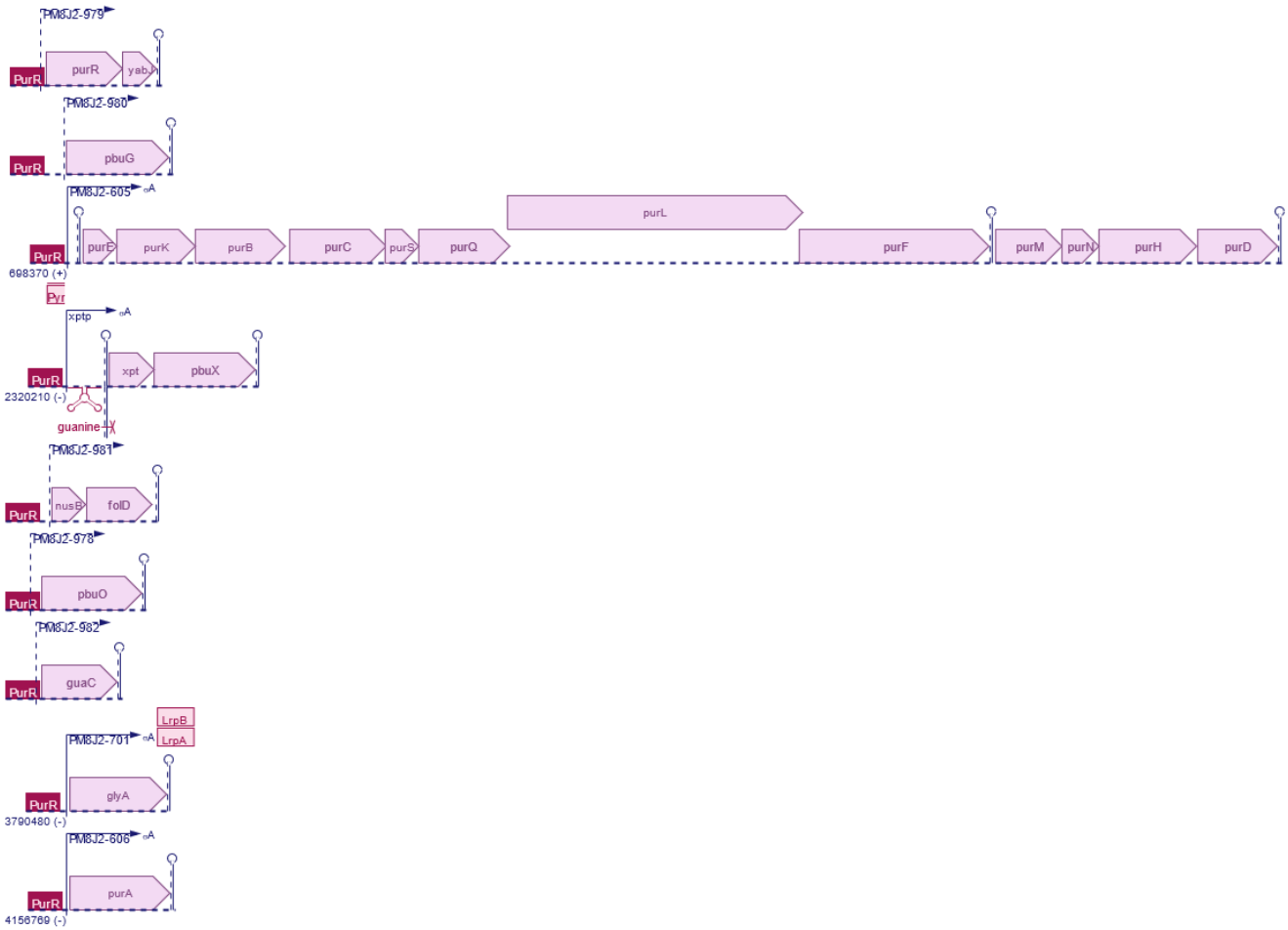


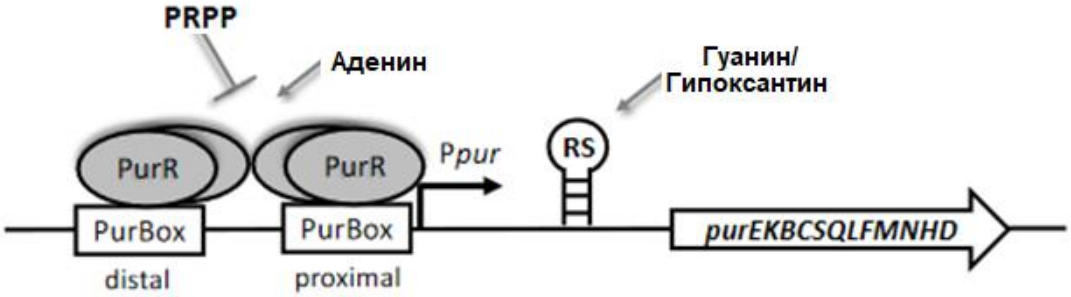
Рис. 16. Схематическое изображение регуляции генов PurR регулона (приведено по https://biocyc.org/gene?orgid=BSUB&id=BSU00470#tab=showAll).

В PurR регулон входят также гены биосинтеза глицина и С1 соединений, *glyA* и *folD*; гены *salvage* пути, *guaC, purA* и *xpt*; гены транспорта пуринов в клетку, *pbuG, pbuO* и *pbuX* [*Weng et al*., 1995; *Saxild et al*., 2001].

PurR осуществляет негативную регуляцию путем специфического связывания с двумя PurR-боксами (PurBox1 и PurBox2), последовательностями ДНК в регуляторных областях генов регулона [*Weng et al*., 1995; *Weng and Zalkin*, 2000; *Saxild et al*., 2001; *Bera et al*., 2003; *Sinha et al*., 2003] (Рис. 17, А).

В *pur*-опероне *B. subtilis* PurBox1 и PurBox2 находятся, соответственно, в положениях от –81 до –68 позиции и от –49 до –36 позиции по отношению к старту транскрипции. Количественные измерения и мутационный анализ показали, что вышестоящий PurBox1 обеспечивает наиболее сильное связывание с репрессором и что для высоко аффинного связывания PurR необходимо взаимодействие репрессора с обоими боксами [*Bera et al*., 2003].

А.



Б.

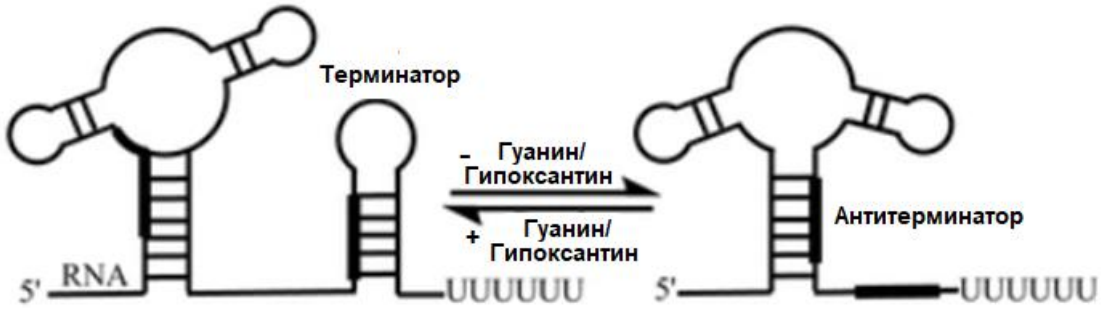


Рис. 17. **А**. Схема регуляции *pur*-оперона по двум механизмам, RurR репрессии (PRPP ослабляет, аденин усиливает репрессию) и терминации транскрипции (гуанин или гипоксантин способствует формированию терминирующей шпильки рибопереключателя). **Б**. Схема работы G-бокс рибопереключателя в отсутствии (-) или присутствии (+) гуанина или гипоксантина.

Показано, что PRPP ингибирует связывание PurR с PurR-боксами, ослабляя репрессию генов регулона [*Weng et al*., 1995]. Поскольку добавление избытка аденина в питательную среду снижает пул PRPP, а добавление гуанозина, наоборот, его увеличивает

[*Saxild and Nygaard,* 1991], присутствие в средах культивирования избытка аденина или гуанозина вызывает, соответственно, усиление или ослабление репрессии генов, принадлежащих PurR регулону [*Weng et al.,* 1995; *Rappu et al.,* 1999; *Saxild et al.,* 2001; *Saxild and Nygaard,* 1991].

Рибопереключатель. У *B. subtilis* и других родственных бактерий помимо PurR репрессора, транскрипция генов так называемого G-бокс-регулона (включающего пуриновый оперон, а также другие гены, вовлеченные в метаболизм пуринов, *xpt-pbuX*, *nupG* и *pbuG),* негативно регулируется по механизму, не требующему присутствия белковых факторов [*Johansen et al.,* 2003] (Рис. 17, А, Б). Этот механизм регуляции основан на лидерных сенсорных РНК или рибопереключателях (riboswitch). Рибопереключатели – это цис-действующие регуляторные элементы, расположенные в 5'-лидерных некодирующих областях мРНК генов (5'-UTR) и способные менять свою пространственную структуру путем специфического взаимодействия с клеточным метаболитом (например, аминокислотой или коферментом), регулируя таким образом транскрипцию [*Mironov et al.,* 2002а] или трансляцию [*Winkler et al.,* 2002б] соответствующих генов. 5'-UTR мРНК *pur*-оперона и других генов G-бокс-регулона содержат рибопереключатель, который связываясь с гуанином (или гипоксантином), образует структуру, обеспечивающую преждевременное прерывание транскрипции [*Mandal et al.,* 2003] (Рис. 17, Б). Таким образом, повышение пулов гуанина (или гипоксантина) у *B. subtilis* приводит к преждевременной терминации транскрипции генов G-бокс-регулона и, следовательно, негативно влияет на синтез пуриновых нуклеотидов.

2.5.1.2. Регуляция на уровне активности ферментов

Этой регуляции подвержены такие вовлеченные в биосинтез и взаимопревращение пуринов ферменты, как глутамин-PRPP-амидотрансфераза (PurF), аденилсукцинатсинтетаза (PurA), IMP дегидрогеназа (GuaB), гуанилаткиназа (Gmk), гипоксантин(гуанин)фосфорибозилтрансфераза (HprT), а также, как будет показано в разделе 4.2.2 главы «Результаты и обсуждение», фермент синтеза метаболического предшественника пуринов, PRPP (PRPP-синтетаза).

Кодируемая геном *purF* глутамин PRPP-амидотрансфераза катализирует начальную реакцию пуринового пути и является ключевым регуляторным ферментом в этом пути (Рис. 11). Фермент содержит С- и N-терминальные домены, которые обеспечивают, соответственно, связывание с субстратом PRPP и регуляцию адениловыми/гуаниловыми нуклеотидами. В ферменте также присутствует 4Fe-4S-кластер, подверженный окислительной инактивации, что обеспечивает деградацию

фермента и остановку пуринового биосинтеза перед споруляцией [*Grandoni et al*., 1989]. Активность PurF строго регулируется по принципу обратной связи конечными продуктами пути биосинтеза *de novo*, адениловыми и гуаниловыми нуклеотидами (ингибирование конечными продуктами биосинтетического пути или ретроингибирование), причем адениловые и гуаниловые нуклеотиды совместно обеспечивают более сильное ингибирование, демонстрируя синергический эффект. Суммарное действие ADP и GMP оказывает наиболее сильный ингибирующий эффект [*Smith et al*., 1994; *Chen et al*., 1997].

Аденилсукцинатсинтетаза катализирует первую из двух реакций превращения IMP в AMP. Соотношение AMP и GMP, а также присутствие в среде пуриновых нуклеотидов и гуанозин пента- и тетрафосфатов ((p)ppGpp) влияют на активность этого фермента [*Saxild and Nygaard*, 1991].

(p)ppGpp синтезируется из GTP/GDP и ATP, и накапливается, когда клетки подвергаются неблагоприятному воздействию среды, что вызывает глобальные метаболические изменения, помогая клеткам адаптироваться к этим условиям. Показано, что накапливающийся в ответ на аминокислотное голодание (p)ppGpp ингибирует у *B. subtilis* активность ферментов Gmk, HprT и в меньшей степени GuaB, резко снижая уровень GTP [*Kriel et al*., 2012]. Это необходимо для быстрой регуляции пула GTP и его поддержания на уровне, не превышающем значений, которые могут быть токсичными для клетки.

Недавняя публикация предполагает для GuaB также наличие положительной регуляции путем связывания производных метионина, наиболее вероятно S-аденозилметионина (SAM) или S-метил-5'-тиоаденозина (MTA) [*Osaka et al*., 2020], что свидетельствует о сопряжении метаболизма пуринов и серосодержащих соединений в клетке.

2.5.2. Рибофлавин

Регуляция биосинтеза рибофлавина, как и в случае пуринов, происходит как на уровне активности ферментов, так и на уровне экспрессии генов биосинтеза. Ключевым ферментом, который лимитирует скорость биосинтеза рибофлавина у продуцентов на основе *B. subtilis*, является GTP-циклогидролаза, продукт гена *ribA* [*Hümbelin et al*., 1999; *Ren et al*., 2005].

Экспрессия генов биосинтеза и транспорта рибофлавина, как и в случае генов биосинтеза пуринов, регулируется по механизму рибопереключателя [*Winkler et al*., 2002a; *Mironov et al*., 2002a] (Рис. 18). У *B. subtilis* ферменты биосинтеза рибофлавина кодируются опероном *ribDEAHT*, который состоит из пяти неперекрывающихся генов.

Оперон содержит три регуляторных элемента. Первый элемент расположен в нетранслируемой лидерной области гена *ribD* и включает промотор и регулирующий транскрипцию *rib*-оперона в зависимости от внутриклеточного содержания FMN рибопереключатель RFN (riboswitch FMN-specific element), а два других – это дополнительные внутренние промоторы P2 и P3, расположенные в дистальной области гена *ribE*, и между генами *ribH* и *ribT*, соответственно [*Sklyarova et al.*, 2012].

Цитоплазматический рибофлавин быстро превращается рибофлавинкиназой в FMN. Последовательность RFN специфически связывается с FMN, что приводит к формированию Rho-независимого терминатора и преждевременной терминации транскрипции генов *rib* оперона. В отсутствии FMN формируется альтернативная структура, обеспечивающая транскрипцию генов биосинтеза рибофлавина. Показано, что в отличие от основного промотора P1, транскрипционные активности внутренних промоторов не зависят от FMN [*Sklyarova et al.*, 2012].

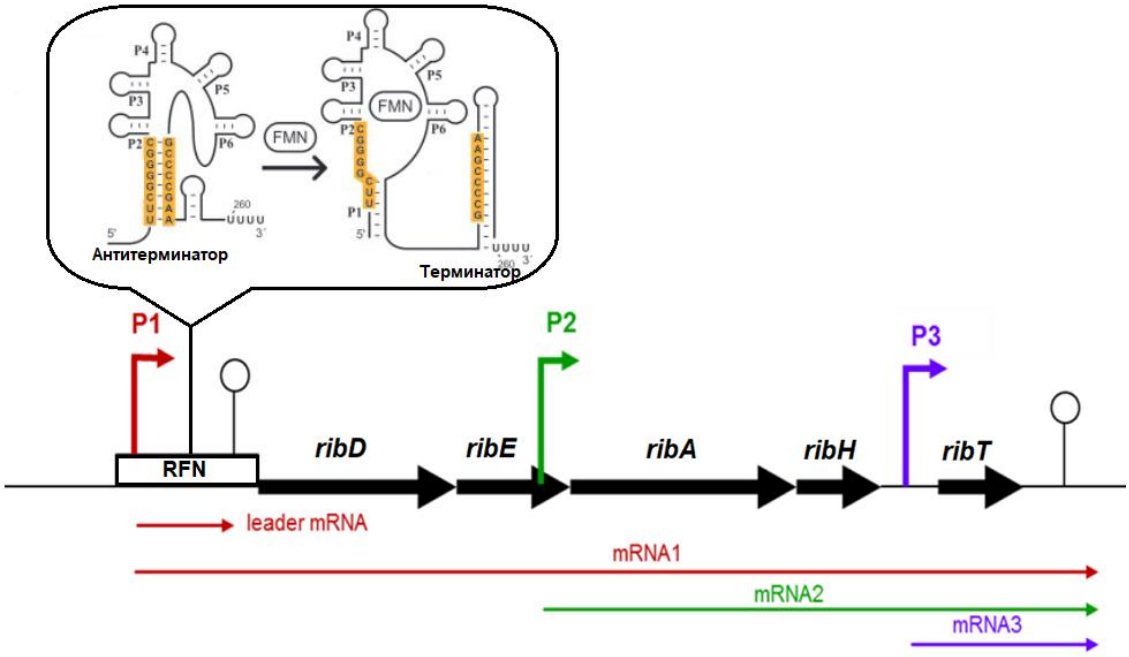


Рис. 18. Схематическое изображение структуры рибофлавинового оперона и регуляции его транскрипции у *B. subtilis*. При связывании последовательности RFN с FMN образуется Rho-независимый терминатор и происходит преждевременная терминация транскрипции генов *rib*-оперона.

FMN-зависимая регуляция по механизму рибопереключателя была также обнаружена у *B. subtilis* и для гена *fmnP* (синонимы *ribU*, *ypaA*) [*Winkler et al.*, 2002a; *Склярова*, 2014; *Pedrolli et al.*, 2015], продукт которого является рибофлавин-связывающим белком семейства ECF (Energy-Coupling Factor), участвующим в ATP зависимом транспорте рибофлавина внутрь клетки [*Winkler et al.*, 2002a; *Rodionov et al.*,

2009; *Vogl et al.,* 2007; *Rempel et al.,* 2019]. Для гена *fmnP* был выявлен комбинаторный механизм действия рибопереключателя RFN, которой при связывании с FMN образует структуру, препятствующую как транскрипции, так и трансляции гена *fmnP* [*Склярова,* 2014; *Pedrolli et al.,* 2015]. Таким образом, чтобы обеспечить доступность витамина, белки биосинтеза и транспорта рибофлавина синтезируются параллельно.

Необходимо отметить, что регуляция экспрессии генов синтеза и транспорта рибофлавина зависит у *B. subtilis* не только от концентрации FMN, но и от присутствия соединений серы. Эта зависимость реализуется при участии белка RibR, РНК-связывающей рибофлавинкиназы [*Solovieva et al.,* 1999; *Pedrolli et al.,* 2015]. Хотя обычно рибопереключатели не используют белковые молекулы для осуществления своей регуляторной функции, для рибопереключателя RFN было показано дополнительное взаимодействие с белком RibR [*Higashitsuji et al.,* 2007]. Оно позволяет модулировать регуляторный контроль рибопереключателя RFN таким образом, чтобы предотвратить подавление экспрессии генов транспорта и биосинтеза рибофлавина даже в присутствии высоких пулов FMN, в том случае, когда потребность во флавинах повышена, например, из-за присутствия токсичных соединений серы в окружающей среде [*Pedrolli et al.,* 2015].

2.6. 5'-Нуклеотидазы бактерий и их роль в метаболизме

2.6.1. Общая характеристика и классификация 5'-нуклеотидаз

5'-Нуклеотидазы (EC 3.1.3.5) – это ферменты, которые катализируют гидролитическое дефосфорилирование 5'-рибонуклеотидов и 5'-дезоксирибонуклеотидов до их соответствующих нуклеозидов и фосфатов ([5'-(deoxy)ribonucleotide + H_2O <=> (deoxy)ribonucleoside + phosphate]). Большинство 5'-нуклеотидаз обладают широкой субстратной специфичностью и являются многофункциональными ферментами, способными отщеплять фосфор не только от молекул мононуклеотидфосфата, но и от множества других фосфорилированных метаболитов. 5'-Нуклеотидазы широко распространены во всех царствах жизни и обнаруживаются в разных клеточных компартментах [*Zimmermann,* 1992]. Хорошо изученные 5'-нуклеотидазы позвоночных играют важную роль в клеточном метаболизме, *salvage* путях пуринов и пиримидинов, репарации нуклеиновых кислот, межклеточной коммуникации, передаче сигналов, контроле за пулами рибо- и дезоксирибонуклеотидов и т. д. Хотя первые свидетельства существования бактериальных 5'-нуклеотидаз были получены около шестидесяти лет назад, к моменту исследований по теме настоящей работы очень мало было известно как о генах, кодирующих соответствующие белки у бактерий, так и о функциях самих

ферментов. В данной главе «Обзора литературы» обобщены текущие знания о микробных 5'-нуклеотидазах, полученные в других лабораториях. Идентификация новых генов 5'-нуклеотидаз у бацилл и характеристика их белковых продуктов, выполненные в ходе исследований по теме данной работы, представлены в разделе 4.2.3. главы «Результаты и обсуждение».

5'-Нуклеотидазы можно классифицировать на основе механизма реакции гидролиза и типа первичного акцептора фосфорильной группы субстрата: активированная молекула воды или нуклеофильный аминокислотный остаток [*Schultz-Heienbrok et al.*, 2005] (Таблица 1). Каталитический механизм, в котором молекула воды используется в качестве первичного акцептора фосфорильной группы, обозначен в таблице как каталитический механизм типа I. Протекающий в два этапа каталитический механизм, в котором нуклеофильный аминокислотный остаток фермента действует как промежуточный акцептор фосфорильной группы, обозначается каталитическим механизмом типа II. Как видно из Таблицы 1, в микробных клетках оба механизма гидролиза используются ферментами, присутствующими во всех возможных формах (растворимые, прикрепленные к клеточной стенке или связанные с мембраной) и локализующимися во всех частях клетки (внутриклеточные и секретируемые, то есть встроенные во внутреннюю мембрану, периплазматические, расположенные на поверхности клетки или внеклеточные). В зависимости от своей молекулярной структуры, типа каталитического механизма и клеточной локализации микробные 5'-нуклеотидазы гидролизуют определенный набор субстратов, проявляют определенный характер регуляции активности и играют определенную физиологическую роль.

Таблица 1. Микробные ферменты, обладающие с 5'-нуклеотидазной активностью

Клеточная локализация	Принадлежность к семейству белков	Каталитический механизм/первичный акцептор фосфорильной группы	Организм	Белок (Номер в базе данных, UniProt или NCBI)	Субстраты	Зависимость от ионов металлов	Ссылки
Связанные с мембраной / прикрепленные к клеточной стенке	Состоит из двух доменов, N-концевого «calcineurin-like phosphoesterase domain (*Metallophos*; PF00149)» и С-концевого «5′-nucleotidase (*5'_nucleotid_C*; PF02872) domain»	Тип I / молекула воды	*Staphylococcus aureus* (G+)	AdsA (UshA) (WP_061821283)	AMP, ADP, ATP, dAMP, GDP, GTP	Mg^{2+}, Mn^{2+}	[*Thammavongsa et al.*, 2011]
			Streptococcus sanguinis (G+)	Nt5e (AFK32764)	AMP, ADP, ATP	Mg^{2+}, Ca^{2+}	[*Fan et al.*, 2012]
			Streptococcus agalactiae (G+)	NudP (CDN66659)	(d)NMP, (d)NDP, но не (d)NTP	Mn^{2+}	[*Firon et al.*, 2014]
			Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* (G+)	5Nuc (AEJ25391)	AMP, ADP, ATP, dAMP	Mg^{2+}, Ca^{2+}	[*Ma et al.*, 2016]
			Streptococcus pyogenes (G+)	S5nA (Q9A0A2)	AMP, ADP, dAMP, CMP, GMP, но не ATP	Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}	[*Zheng et al.*, 2015]
			Streptococcus suis (G+)	Ssads (CAR45827)	AMP, ADP, ATP	Mn^{2+}	[*Liu et al.*, 2014]
			Streptococcus iniae (G+)	S5nAi (WP_003099850)	ADP, AMP, dAMP, GMP, CMP, TMP, но не ATP	Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}	[*Soh et al.*, 2018]
			Bacillus anthracis (G+)	AdsA **(**Q6HTQ7)	dAMP	Mn^{2+}	[*Thammavongsa et al.*, 2009]
			Vibrio parahaemolyticus (G-)	NutA (UshA) (P22848)	AMP, ADP, ATP	Cl^{-}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}	[*Itami et al.*, 1989; [*Sakai et al.*, 1987]
			Vibrio (*Salinivibrio*) *costicola* (G-)	UshA (WP_102505627)	NMP, NDP, NTP	Cl-	[*Bengis-Garber and Kushner*, 1981]
			Shewanella violacea (G-)	UshA (WP_041419915)	AMP, ATP, GTP	Mg^{2+}, Mn^{2+}	[*Kuribayashi et al.*, 2017]
			Shewanella amazonensis (G-)	UshA (WP_011760134)			
	Class C кислых фосфатаз (cd07534); принадлежит к HAD-like superfamily (IPR036412)	Тип II / нуклеофильный аминокислотный остаток фермента	*Helicobacter pylori* (G-)	HppA (Q6UC93)	NMP	Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}	[*Reilly and Calcutt*, 2004]
			Clostridium perfringens (G+)	CppA (ACB11490)	UMP, GMP, AMP, 3′ TMP, ATP, 3′ AMP, FMN, R5P, пиридоксальфосфат, ADP, 2′ AMP, $NADP^{+}$	Cu^{2+}, Co^{2+}, Cr^{2+}	[*Reilly et al.*, 2009]
			Chryseobacterium meningosepticum (*Elizabethkingia meningoseptica*) (G-)	OlpA (O08351)	NMP, 3′ AMP	Cu^{2+}, Mg^{2+}	[*Passariello et al.*, 2003]
			Haemophilus influenzae (G-)	Lipoprotein Hel [e (P4)] (WP_118891437)	Арилфосфаты	Cu^{2+}	[*Reilly et al.*, 1999]
	Состоит из двух доменов, «alkaline-phosphatase-like, core domain superfamily	Тип II / нуклеофильный аминокислотный	*Francisella tularensis* (G-)	AcpA (WP_003027314)	NMP, NTP, NDP, FMN, NMN, $NADP^{+}$ и др.	Me^{2+}	[*Mohapatra et al.*, 2007; *Reilly et al.*, 2006]

	(IPR017850)» и «Phosphoesterase (IPR007312)»; принадлежит к «Phosphoesterase family (PF04185)»	остаток фермента					
В периплазме	Состоит из двух доменов, N-концевого «calcineurin-like phosphoesterase domain (*Metallophos*; PF00149)» и С-концевого «5′-nucleotidase (*5'_nucleotid_C*; PF02872) domain»	Тип I / молекула воды	*Escherichia coli* (G-)	UshA (P07024)	(d)NTP, бис (5'-нуклеозидил) полифосфаты, UDP-сахара, CDP-спирты, NAD(H)	Zn^{2+}, Co^{2+}или Mg^{2+}, в зависимости от типа гидролазной активности	[*Alves-Pereira et al.*, 2008; *Ruiz*, 1989; *Glaser et al*., 1967; *Neu*, 1967; *Wang et al.*, 2014]
			Vibrio cholerae (G-)	UshA (Q9KQ30)	dNTP	-	[*McDonough et al*., 2016]
			Yersinia intermedia (G-)	UshA (A4URQ8)	(d)NTP, бис (5'-нуклеозидил) полифосфаты, UDP-сахара, CDP-спирты	Co^{2+} or Mg^{2+}, или Mg^{2+}, в зависимости от типа гидролазной активности	*Alves-Pereira et al.*, 2008; *Neu*, 1967]
			Shewanella oneidensis (G-)	UshA (Q8EFH1)	FAD, AMP	-	[*Covington et al.*, 2010]
			Haemophilus influenzae (G-)	NadN (P44569)	AMP, NAD^{+}, UDP-сахара	Zn^{2+}	[*Garavaglia et al*., 2012
			Klebsiella aerogenes (*Enterobacter aerogenes*) (G-)	UshA (A0A0H3FPS2)	UDP-сахара	-	[*Lee et al*., 2000]
	Class A кислых фосфатаз (IPR001011)	Тип II / нуклеофильный аминокислотный остаток фермента	*Morganella morganii* (*Proteus morganii*) (G-)	PhoC (P28581)	UMP, AMP, 3'-UMP, 3'-AMP	-	[*Thaller et al*., 1994]
	Кислые фосфатазы «class B-like (IPR005519)» или «HAD superfamily, subfamily IIIB (acid phosphatase) (PF03767)»		*Morganella morganii* (*Proteus morganii*) (G-)	NapA (AphA) (Q59544)	NMP, 3' NMP, арилфосфаты, β-глицерофосфат, фосфорилированные сахара, но не диэфиры	Mg^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}	[*Thaller et al*., 1995]
			Salmonella enterica (G-)	AphA (QQL85243)	UMP, 3' -UMP, pNPP a-нафтолфосфаты, но не диэфиры	Mg^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}.	[*Uerkvitz and Beck,* 1981]
			Escherichia coli (G-)	AphA (P0AE22)	3'-(d)NMP, (d)NMP	Mg^{2+}	[*Thaller et al*., 1997]
	Щелочные фосфатаза (PF00245)		*Escherichia coli* (G-)	PhoA (P00634)	Широкий спектр фосфатных моноэфиров, включая 5′-рибо- и 5′-дезоксирибонуклеотиды	Mg^{2+}, Zn^{2+}	[*Garen and Levinthal*, 1960]
Внеклеточная	Состоит из двух доменов, N-концевого «calcineurin-like phosphoesterase domain (*Metallophos*; PF00149)» и С-концевого «5′-nucleotidase (*5'_nucleotid_C*;	Тип I / молекула воды	*Corynebacterium glutamicum* (G+)	UshA (WP_011896359)	GMP, IMP, XMP, AMP, UMP, CMP, ADP, ATP, dATP	Co^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, depending on the type of hydrolase activity	[*Rittmann et al*., 2005]

	PF02872) domain»						
	PRK09419 Superfamily (мультифункциональные 2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase/3'-nucleotidase/5'-nucleotidase), содержат два домена, N-концевой «calcineurin-like phosphoesterase domain (*Metallophos*; PF00149)» и C-концевой «5′-nucleotidase (*5′_nucleotid_C*; PF02872) domain		*Bacillus subtilis* (G+)	YfkN (BAA23404.1)	3′-нуклеотиды, 2'3'-циклические нуклеотиды и 5'-нуклеотиды	-	[*Chambert et al*., 2003]
Внутриклеточная	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IIA (IPR006357)	Тип II / нуклеофильный аминокислотный остаток фермента	*Escherichia coli* (G-)	YigB (P0ADP0)	ArPP, FMN	Mg^{2+}	[*Haase et al*., 2013; *Kuznetsova et al*., 2006]
			Bacillus subtilis (G+)	**YutF (NucF) (WP_003243196)**	R5P, XMP, PRPP, IMP, GMP, dGMP, dIMP	Mg^{2+}	[***Zakataeva et al.*, 2016**]
			Escherichia coli (G-)	UmpH (NagD) (C3TJ42)	UMP, GMP, (d)NTP, G1P	Mg^{2+}	[*Kuznetsova et al*., 2006; *Tremblay et al.*, 2006
	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA (IPR006439)		*Escherichia coli* (G-)	YjjG (P0A8Y1)	dTMP, dUMP, UMP, неканонические производные пиримидинов	Mn^{2+}, Mg^{2+}	[*Kuznetsova et al*., 2006; *Proudfoot et al*., 2004; *Titz et al*., 2007]
			Bacillus subtilis (G+)	**YitU (P70947)**	FMN, ArPP, (d)NMP, AICAR	Mg^{2+}	[***Yusupova et al.*, 2014;** *Sarge et al*., 2015; ***Yusupova et al.*, 2020**]
	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IIB (IPR006379)		*Bacillus subtilis* (G+)	YcsE (P42962)	ARPP, FMN, IMP, AMP, GMP, CMP, UMP, G6P	Mg^{2+}	[*Sarge et al.*, 2015; *Terakawa*, 2016]
	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IG, 5'-nucleotidase (IPR008380)		*Legionella pneumophila* (G-)	cN-II (Q5ZZB6)	GMP, dGMP, IMP, pNPP	Mg^{2+}	[*Srinivasan et al*., 2014]
	HD-domain phosphohydrolases (PF01966)	Тип I / молекула воды	*Escherichia coli* (G-)	YfbR (P76491)	dNMP	Co^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}	[*Proudfoot et al.*, 2004; *Zimmerman et al*., 2008]
	SurE family (PF01975) или survival protein SurE (IPR030048)	Тип I / молекула воды	*Escherichia coli* (G-)	UmpG (SurE) (P0A840)	(d) NMP, 3′-AMP, полифосфаты, преимущественно короткоцепочечные ($P_{20–25}$)	Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Mg^{2+}	[*Proudfoot et al*., 2004]

Примечания: (G-) и (G+) – грамотрицательные и грамположительные бактерии, соответственно; – - нет данных; ферменты, исследованные в данной диссертационной работе выделены жирным шрифтом; ссылки, выделенные жирным шрифтом, приведены в списке работ, опубликованных по теме диссертации

2.6.2. Секретируемые 5'-нуклеотидазы

К секретируемым 5'-нуклеотидазам относятся ферменты, не локализующиеся в цитоплазме клетки. Они могут прикрепляться к внутренней мембране, располагаться в периплазматическом пространстве, «заякориваться» в клеточной стенке или даже секретироваться в среду культивирования. Эти ферменты используют либо I, либо II механизм гидролиза субстратов и имеют разнообразные функции, наиболее важные из которых – это ассимиляция экзогенных фосфорилированных соединений в качестве питательных веществ, а также влияние на свойства вирулентности патогенов.

Среди бактерий, у которых обнаружены секретируемые (связанные с мембраной или закрепленные на клеточной стенке) 5'-нуклеотидазы, есть много патогенных и условно патогенных видов (Таблица 1). Хорошо известно, что локализующиеся на поверхности белки часто играют важную роль во взаимодействии между патогенными бактериями и их хозяином. Действительно, 5'-нуклеотидазы такой локализации, оказались клинически значимыми факторами вирулентности патогенных бактерий. Так, у *S. aureus* и других грамположительных кокков 5'-нуклеотидазы этого типа увеличивают внеклеточные концентрации аденозина, обладающего мощным иммуносупрессивным действием, что помогает этим бактериям нарушать иммунную защиту хозяина и выживать в его тканях во время инфекции [*Thammavongsa et al.,* 2009]. Сходную защитную роль играют расположенные на поверхности клетки и внеклеточные секретируемые бактериальные 5'-нуклеотидазы, специфичные к dAMP. Действуя совместно с внеклеточными нуклеазами, они превращают ДНК нейтрофилов в дезоксиаденозин, который запускает опосредованную каспазой-3 смерть иммунных клеток [*Fan et al.,* 2012; *Thammavongsa et al.,* 2013; *Ma et al.,* 2016].

Хотя для поверхностно расположенных 5'-нуклеотидаз из грамотрицательных патогенных бактерий не было напрямую показано, что они являются факторами вирулентности, можно предположить, что эти ферменты также могут контролировать иммунный ответ хозяина, моделируя в процессе дефосфорилирования соответствующие концентрации про- и противовоспалительных соединений. Это предположение подтверждается тем фактом, что секретируемые 5'-нуклеотидазы *V. cholerae* участвуют в подавлении клеточных ответов во время инфекции хозяина [*Punj et al.,* 2000]. Более того, весьма вероятно, что хроническое продолжительное изъязвление и отсутствие воспалительной реакции при инфекции кожи и тканей человека из-за инвазии *Shewanella* spp. [*Sharma and Kalawat,* 2010] может быть связано с подавлением иммунных ответов связанными с мембраной, расположенными на поверхности 5'-нуклеотидазами этой бактерии.

Роль периплазматических 5'-нуклеотидаз в клеточном метаболизме также оказалась шире, чем просто ассимиляция экзогенных фосфорилированных соединений как источника питательных веществ. Ингибирующий эффект фермента UshA из *E. coli*, приводящий к гиперпродукции аденозина, на активность тирозинкиназы p56lck человека и других протеинкиназ указывает на потенциальную роль этой и других периплазматических 5'-нуклеотидаз энтеропатогенных *E. coli* и других патогенных бактерий в подавлении имунных реакций хозяина [*Berger et al.*, 1996].

2.6.3. Внутриклеточные 5'-нуклеотидазы

Как описано выше, секретируемые 5'-нуклеотидазы участвуют в метаболизме внеклеточных нуклеотидов, отвечают за их ассимиляцию в качестве источников питательных веществ, а также являются факторами вирулентности. Основная роль внутриклеточных нуклеотидаз в клетке заключается в регуляции пулов внутриклеточных нуклеотидов для поддержания синтеза ДНК и РНК.

Внутриклеточные 5'-нуклеотидазы, использующие каталитический механизм типа I. Внутриклеточные микробные 5'-нуклеотидазы, которые используют каталитический механизм типа I, действуют как фосфогидролазы и используют ионы металлов для катализа реакции переноса молекулы фосфорила на молекулу воды. Представители таких ферментов были найдены у бактерий (Таблица 1).

5'-Нуклеотидаза YfbR из *E. coli* принадлежит к суперсемейству HDD (PF01966), белки которого характеризуется наличием двух гистидин-аспартатных доменов. Белок YfbR образует димер и обладает 5'-дезоксирибонуклеотидазной активностью по отношению к различным 2'-дезоксирибонуклеотид-5'-монофосфатам (dNMP) [*Zimmerman et al.*, 2008]. Кофакторами гидролиза для YfbR являются ионы Co^{2+}, а также Mn^{2+} и Cu^{2+}.

Другой фермент из *E. coli*, UmpG, принадлежит семейству SurE (PF01975). Представители этого семейства обнаружены у эубактерий (за исключением грамположительных бактерий), архей и эукариот [*Proudfoot et al.*, 2004], содержат характерный N-концевой аспартат-аспартатный (DD) мотив и обладают 5'- и 3'-нуклеотидазной и экзополифосфатазной активностями. Предполагается, что эти белки участвуют в обеспечении выживания в стационарной фазе роста. Изучение молекулярных структур некоторых членов семейства SurE из *Thermotoga maritima* [*Lee et al.*, 2001; *Zhang et al.*, 2001], *Thermus thermophilus* [*Iwasaki and Miki*, 2007] и *Pyrobaculum aerophilum* [*Mura et al.*, 2003], показало, что белки SurE содержат каталитически активный N-концевой домен и C-концевой домен, который участвует в поддержании олигомерного состояния белка. Хотя каталитический механизм членов семейства

SurE до конца не выяснен, но предполагается, что он протекает по реакции типа I и использует молекулу воды в качестве исходного акцептора фосфорильной группы.

Внутриклеточные микробные 5'-нуклеотидазы, использующие каталитический механизм типа II. Большинство внутриклеточных 5'-нуклеотидаз этого типа, охарактеризованных на сегодняшний день, принадлежат к суперсемейству HAD [*Koonin and Tatusov*, 1994]. Это обширное суперсемейство включает ферменты фосфатазы, фосфонатазы, АТФазы Р-типа, бета-фосфоглюкомутазы, фосфоманномутазы и дегалогеназы, катализирующие реакции переноса углеродной или фосфорильной группы с молекул огромного количества различных субстратов. Эти ферменты участвуют во множестве клеточных процессов, от биосинтеза аминокислот до детоксикации клеток.

Все члены суперсемейства HAD содержат 1) высоко консервативный «сердцевинный» или основной домен (по-английски “core domain”), характеризующийся трехслойным α/β-сэндвичем, состоящим из повторяющихся β–α-звеньев (так называемая Россманноподобная или Россманноидная складка), который создает каталитический каркас, и 2) вставку, так называемую «крышку» или «кэп-домен» (по-английски «cap» или «capping» domain), который десольватирует активный сайт для катализа и обеспечивает субстратную специфичность (Рис. 19) [*Burroughs et al*., 2006; *Allen and Dunaway-Mariano*, 2009].

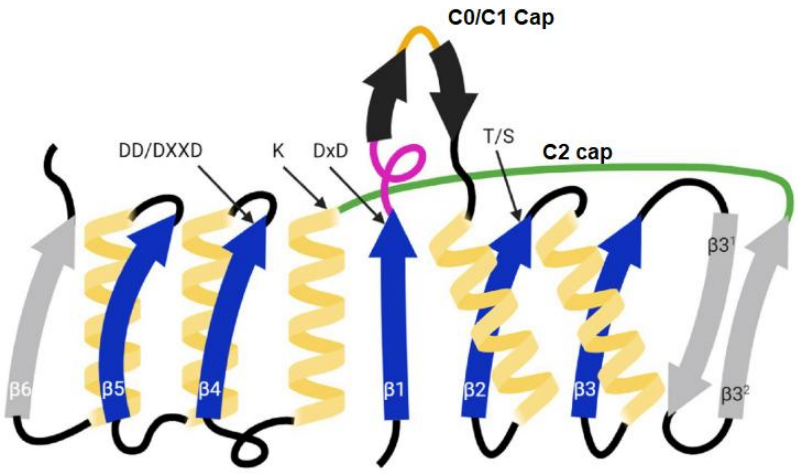


Рис. 19. Схематическое изображение вторичной структуры белков суперсемейства HAD. Основной домен состоит из последовательных повторов мотива, состоящего из β-листа (синяя или серая стрелки), соединительной петли (черные линии), и α-спирали (желтые спирали). Консервативные и неконсервативные β-листы (обнаруженные не у всех представителей семейства) показаны синими и серыми стрелками, соответственно (стрелка указывает в направлении С-конца белка). Вставки известных кэп-доменов, C0/C1 cap и C2 cap, показаны оранжевым и зеленым, соответственно. Консервативные аминокислотные остатки, характерные для всех членов суперсемейства HAD, и их положение в белке, указаны буквами и стрелками, соответственно. D, аспартат; T, треонин; S, серин; X, любой а. о.

В зависимости от типа кэп-домена (C0, C1 или C2 (C2A/C2B)), их топологии и расположения, члены суперсемейства HAD делятся на четыре подсемейства: I, IIA, IIB и III.

Каталитический каркас белка суперсемейства HAD состоит из четырех петель, содержащих аминокислотные остатки мотивов I-IV. Мотив I (DXDX (T/V), где D – аспартат, T – треонин, V – валин, а X – любая аминокислота) содержит два остатка аспартата, которые координируют кофактор Mg^{2+}. Первый остаток аспартата индуцирует нуклеофильную атаку фосфата субстрата, а второй остаток отдает протон оставшемуся нуклеозиду. Мотив II (T/S), который характеризуется наличием высоко консервативного остатка треонина или серина на своем конце, и мотив III (K/R), который содержит консервативный остаток лизина (или аргинина), совместно участвуют в стабилизации промежуточных продуктов реакции гидролиза. Мотив IV содержит сочетание аминокислотных остатков, одно из трех, DD, GDXXXD (G – глицин) или GDXXXXD. Кислые аминокислотные остатки вместе с такими же остатками мотива I способствуют позиционированию иона Mg^{2+} в активном центре [*Burroughs et al.*, 2006]. Активный сайт расположен на границе раздела между основным доменом и кэп-доменом, и включает каталитические аминокислотные остатки основного домена и большинство остатков кэп-домена, которые определяют субстратную специфичность фермента (Рис. 20).

Рис. 20. Изображение трехмерной структуры белка *E. coli* UmpH (NagD) (PDB: 2C4N), принадлежащего суперсемейству HAD, подсемейству IIA. Элементы вторичной структуры окрашены так же, как и на Рис. 19; последовательность, отвечающая за специфичность к субстрату, показана красным.

Большинство ферментов суперсемейства HAD (примерно 80%) представляют собой гидролазы моноэфирных фосфатов (фосфатазы). Эти ферменты используют каталитический механизм типа II, катализируя двухступенчатое дефосфорилирование субстратов. Субстрат связывается своими фосфатными и рибозными фрагментами в центральном домене и основным фрагментом в кэп-домене. Первым этапом ферментативной реакции является нуклеофильная

атака фосфорильной группы субстрата аспартатным остатком в мотиве I, приводящая к образованию промежуточного фосфоэнзима. Вторая стадия – гидролиз промежуточного соединения аспартилфосфата и образование неорганического фосфата (Рис. 21).

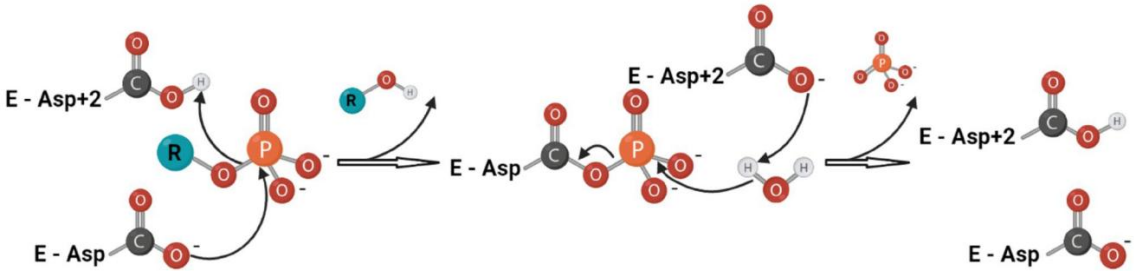


Рис. 21. Схематическое изображение общего каталитического механизма фосфогидролаз, членов суперсемейства HAD. Катализ протекает через промежуточное соединение – аспартилфосфат. E, фермент; Asp – аминокислотный остаток аспартат; C, P, O, H, R, атомы углерода, фосфора, кислорода, водорода и углеводородный радикал, соответственно.

В геноме *E. coli* было идентифицировано множество генов, кодирующих растворимые фосфатазы (5'-нуклеотидазы) суперсемейства HAD [*Proudfoot et al.*, 2004; *Kuznetsova et al.*, 2006]. Были изучены субстратные специфичности этих ферментов. Было показано, что большинство фосфатаз суперсемейства HAD обладают очень широкими и перекрывающимися, однако не неидентичными профилями субстратов. Наряду с три-, ди- и монофосфатами дезоксирибо- и рибонуклеозидов, 5'-нуклеотидазы суперсемейства HAD могут гидролизовать промежуточные продукты различных метаболических путей, фосфорилированные сахара и полифосфаты. Примечательно, что большинство этих ферментов также могут распознавать небольшие молекулы фосфодоноров (например, ацетилфосфат, карбамоилфосфат и амидофосфат), которые обычно используются для аутофосфорилирования акцепторных доменов двухкомпонентных систем передачи сигналов [*Kuznetsova et al.*, 2006].

Наиболее хорошо изучена UMP-фосфатаза *E. coli* UmpH (NagD) (продукт гена *nagD*). Было показано, что этот фермент может гидролизовать дезоксирибо- и рибонуклеозид три-, ди- и монофосфаты, а также полифосфат и G1P [*Kuznetsova et al.*, 2006], однако демонстрирует наибольшее сродство к UMP и GMP [*Tremblay et al.*, 2006; *Reaves et al.*, 2013]. Эта специфичность фермента к UMP и GMP определяет важную роль UmpH в клеточном метаболизме, и в частности, в регуляции биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов и поддержании их физиологических концентраций в клетке. Известно, что первый фермент пиримидинового пути у *E. coli* аллостерически ингибируется CTP [*Pardee and Yates*, 1956]. Однако физиологические последствия нарушения этой регуляции ранее не исследовались. Reaves et al. [2013] показали альтернативную регуляторную стратегию, которая позволяет точно контролировать уровни конечных продуктов пиримидинового пути. Механизм включает негативную регуляцию фермента уридинмонофосфаткиназы (*pyrH*) по типу обратной связи

(Рис. 22). Эта регуляция приводит к накоплению UMP, который, в свою очередь, разлагается фосфатазой UmpH. Этот фермент имеет значительно более высокую константу Михаэлиса, K_M, (0,12 мМ), чем физиологическая концентрация UMP (0,052 мМ). Поэтому он превращает UMP в уридин только в условиях избыточной продукции этого нуклеотида, что обеспечивает гомеостаз уровней UTP и CTP за счет выведения производного уридина – урацила (Рис. 22), снижая внутриклеточные концентрации UMP даже в условиях нерегулируемого биосинтеза (сверхсинтеза) пиримидинов.

Таким образом, для поддержания физиологических пулов пиримидина клетка использует двойную регуляторную стратегию: классическое ингибирование по принципу обратной связи, и, если по каким-то причинам этот механизм не работает (например, у мутантов со снятым ретроингибированием), то дополнительно включается в работу фосфатаза UmpH или другой фермент с похожей функцией, UmpG, принадлежащий другому семейству (SurE) и имеющий другой механизм гидролиза (I тип).

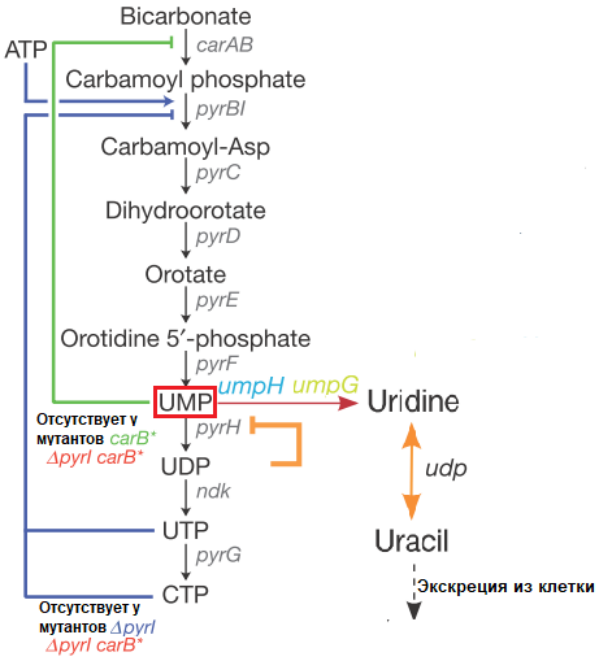


Рис. 22. Схема биосинтеза и регуляции пулов пиримидиновых нуклеотидов в клетках *E. coli*. Карбамоилфосфатсинтетаза (*carAB*) ингибируется UMP, по принципу обратной связи. Аспартат-транскарбамоилаза (*pyrBI*) ингибируется UTP и CTP также по принципу обратной связи, и активируется ATP. Уридинмонофосфаткиназа (*pyrH*) ингибируется UDP по принципу обратной связи.

Другие фосфатазы суперсемейства HAD из *E. coli*, YigB и YbjI, предпочтительно используют FMN в качестве субстрата, а их паралог SerB участвует в пути биосинтеза серина, дефосфорилируя фосфосерин [*Kuznetsova et al.*, 2006].

В отличие от 5'-нуклеотидаз млекопитающих и *E. coli*, знания о внутриклеточных 5'-нуклеотидазах в грамположительных бактериях к началу данной работы были очень скудными.

Поскольку поиск и изучение генов 5'-нуклеотидаз и их продуктов у бактерий рода *Bacillus* представляли как научный, так и практический интерес, мы посвятили этой задаче исследования, изложенные в разделе 4.2.3 главы «Результаты и обсуждение».

2.7. Транспорт аминокислот и пуриновых соединений из клеток бактерий

Клетки микроорганизмов поглощают и выделяют в окружающую среду различные низкомолекулярные соединения и биополимеры. Поскольку цитоплазматическая мембрана клеток является эффективным барьером даже для небольших растворимых соединений, их перемещение через мембрану осуществляется с помощью специальных транспортных систем.

Клетки *B. subtilis* способны поглощать из среды пуриновые и пиримидиновые основания и нуклеозиды и использовать эти соединения в качестве источников углерода и азота, а также в качестве субстратов для биосинтеза нуклеотидов через путь *salvage*. К настоящему моменту у *B. subtilis* охарактеризовано несколько транспортеров для усвоения пуринов. Это белки, обладающие широкой специфичностью и использующие для транспорта энергию электрохимического потенциала $\Delta\mu H^+$: транспортер пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов NupG; транспортер аденозина и пиримидиновых нуклеозидов NupC; высокоспецифичный транспортер гуанина и гипоксантина PbuG; транспортер ксантина, PbuX, транспортеры гипоксантина и гуанина PbuG и PbuO, а также ATP-зависимый транспортер гуанозина и, возможно, других нуклеозидов, NupNOPQ [*Saxild and Nygaard,* 1987; *Saxild et al*., 2001; *Switzer et al*., 2002; *Johansen et al*., 2003; *Belitsky and Sonenshein,* 2011].

В отличие от транспорта внутрь клетки, о наличии и физиологической роли которого было известно очень давно, данные о существовании активного транспорта из клеток (эфлюкса или экскреции) стали появляться гораздо позднее. Долгое время считалось, что различные вещества выводятся из клеток пассивно, в результате диффузии или изменений в структуре цитоплазматической мембраны. В конце 1970-х годов были опубликованы сведения о системах MDR (Multidrug Resistance), обеспечивающих множественную лекарственную устойчивость путем экскреции антибиотиков, ионов тяжелых металлов, органических растворителей, антисептиков и т.д. [*Nikaido,* 1994]. Однако целесообразность существования систем выброса из клеток естественных метаболитов, синтезированных с большими затратами углерода и энергии, была неочевидна и поначалу воспринималась мировым научным сообществом скептически.

Только начиная с конца 1990-ых годов в зарубежных лабораториях, а также в лаборатории Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов («ГосНИИгенетика») и затем теми же исследователями в составе учрежденного в 1998 году АО (ранее ЗАО) «АГРИ» было достоверно показано наличие транспортеров, участвующих в экскреции ключевых метаболитов из клеток.

Первый транспортер экскреции, LysE из *Corynebacterium glutamicum*, был описан в 1996 году в Германии в исследовательском центре города Юлих [*Vrljic et al*., 1996]. Вскоре автором данной диссертационной работы и его коллегами под руководством Лившица В. А. были впервые идентифицированы и охарактеризованы гены, кодирующие экспортеры аминокислот у *E. coli* (*rhtA, rhtB, rhtC, leuE* и др.) [*Zakataeva et al.*, 1999; *Aleshin et al*., 1999б; *Livshits et al.*, 2003б; *Kutukova et al*., 2005]. За этим последовали новые исследования, выявившие целый ряд генов, продукты которых выполняют экскреторную функцию (Таблица 2).

Было показано, что хотя эти белки принадлежат к различным семействам и имеют разное число трансмембранных сегментов (TMS), в большинстве случаев их объединяет использование энергии мембранного потенциала как источника энергии для активного транспорта (вторичный транспорт). Однако среди экспортеров аминокислот были охарактеризованы и те, которые используют ATP в качестве энергии транспорта. В качестве примера такой транспортной системы можно привести осуществляющий экскрецию цистеина комплекс белков экспортеров CydD и CydC (3.A.1.129.1 в базе данных Transport Classification Database). Каждый из этих двух белков состоит из N-концевого домена, содержащего 6 TMS и гидрофильного С-концевого домена, содержащего сайт связывания ATP [*Cruz-Ramos et al*., 2004]. Самое большое и разнообразное суперсемейство, объединяющее вторичные транспортеры из всех доменов жизни – MFS (Major Facilitator Superfamily) [*Pao et al*., 1998; *Law et al*., 2008]. Оно включает 87 различных семейств и несколько категорий белков: (1) унипортеры, транспортирующие только один тип субстрата за счет градиента субстрата, (2) симпортеры, одновременно транспортирующие два или более субстрата в одном направлении за счет электрохимического градиента, и (3) антипортеры, транспортирующие через мембрану в противоположном направлении два или более субстрата [*Law et al*., 2008].

Важной особенностью многих охарактеризованных экспортеров аминокислот является относительно низкое сродство к субстрату и широкая субстратная специфичность, что роднит их с белками множественной лекарственной устойчивости [*Nikaido*, 1994].

Несмотря на важную роль пуриновых нуклеозидов в метаболизме клеток, в сравнении с аминокислотными экспортерами знания о выбросе нуклеозидов из клеток вплоть до начала 2000-ых практически отсутствовали. К моменту начала исследований, представленных в данной работе, был известен единственный экспортер пуриновых соединений – это экспортер оснований, аденина и гипоксантина, продукт гена *pbuE* (*ydhL*) из *B. subtilis* [*Johansen et al.*, 2003; *Nygaard and Saxild*, 2005; *Mandal and Breaker*, 2004].

Таблица 2. Транспортеры аминокислот из клеток бактерий.

Белок/ген	Семейство	Субстраты	TMS	Регуляция	Ссылки
Corynebacterium glutamicum					
LysE/*lysE*	LysE	Лизин, аргинин	6	Lys G	[*Vrljic et al*., 1996; *Bellmann et al*., 2001]
ThrE/*thrE*	ThrE	Треонин, серин	10	–	[*Simic et al*., 2001]
BrnEF/*brnEF*	Liv-E	Разветвленные аминокислоты, метионин	4/7	Lrp	[*Kennerknecht et al*., 2002; *Trötschel et al*., 2005]
MscS/*NCgl1221*	MscS	Глутамат, аспартат	4	В зависимости от состояния мембраны	[*Nakamura et al.*, 2007]
Escherichia coli					
RhtA/*rhtA*	DME	Треонин, гомосерин, лизин, пролин и др.	10	Стрессовые условия	[*Livshits et al*., 2003б]
RhtB/*rhtB*	RhtB	Треонин, гомосерин	6	Стрессовые условия	[*Aleshin et al*., 1999б; *Zakataeva et al*., 1999]
RhtC/*rhtC*	RhtB	Треонин	6	Стрессовые условия	[*Aleshin et al*., 1999б; *Zakataeva et al*., 1999]
LeuE/*yeaS*	RhtB	Лейцин, метионин, гистидин, изолейцин и др.	6	Lrp	[*Лившиц и др.*, 2001; *Kutukova et al*., 2005]
EamA/*ydeD*	DME	*O*-ацетилсерин, цистеин, аспарагин, глутаминn	10	–	[*Dassler et al*., 2000]
EamB/*yfiK*	RhtB	*O*-ацетилсерин, цистеин, азасерин, пролин, треонин	6	–	[*Лившиц и др.*, 2001; *Franke et al*., 2003]
ArgO/*yggA*	LysE	Аргинин, лизин	6	ArgP	[*Лившиц и др.*, 2001; *Nandineni and Gowrishankar*, 2004]
YddG/*yddG*	DME	Фенилаланин, тирозин, триптофан	10	–	[*Livshits et al*., 2003а; *Doroshenko et al*., 2007]
YgaZH/*ygaZH*	Liv-E	Разветвленные аминокислоты, метионин	5/3	Lrp	[*Tabolina et al.*, 2005; *Park et al*., 2007]
CydDC/*cydDC*	ABC	Цистеин	6/6	–	[*Pittman et al.*, 2002; *Cruz-Ramos et al.*, 2004]

Примечания: –, нет данных; экспортеры, исследованные в данной диссертационной работе на способность экскретировать пуриновые нуклеозиды, выделены жирным шрифтом.

PbuE – это мембранный белок с 12 трансмембранными сегментами, с состоящий из 388 аминокислотных остатков. Nygaard and Saxild [2005] исследовали функции продукта гена и показали, что при увеличении экспрессии *pbuE* происходило снижение внутриклеточных пулов пуриновых оснований. Так, например, было обнаружено, что в штамме с двумя делециями, Δ*purF* (ауксотроф по пуринам) и Δ*pbuG* (нарушение транспорта гипоксантина в клетку), повышение экспрессии гена *pbuE*, приводило к значительному замедлению роста в присутствии различных пуриновых соединений.

Хотя сам белок и его функции были недостаточно хорошо изучены, и его участие в экспорте пуриновых оснований основывалось на некоторых косвенных данных, регуляция экспрессии гена *pbuE* была изучена достаточно подробно. Транскрипция гена регулируется по механизму аденин-зависимого рибопереключателя, A-бокса [*Mandal and Breaker*, 2004] (Рис. 23). В отличие от негативной регуляции G-бокса, для которой эффекторами являются гипоксантин и гуанин, транскрипция A-бокса активируется в присутствие аденина и его аналога 2,6-диаминопурина [*Mandal and Breaker*, 2004]. Оказалось, что нуклеотидные последовательности рибопереключателей G-бокс и A-бокс очень похожи. Была описана замена в лидерной области мРНК *pbuE*, U70→C, которая обеспечивает конститутивную экспрессию гена *pbuE* в отсутствие аденина [*Mandal and Breaker*, 2004]. Интересно, что комбинация U70→C и замены A100→G меняет тип связываемого пурина, и активатором экспрессии гена *pbuE* вместо аденина становится гуанин [*Serganov et al*., 2004; *Лобанов и др*., 2007].

Необходимо упомянуть, что когда экспериментальная часть данной диссертационной работы была завершена, появились две публикации, касающиеся функции гена *ydhC* (*punC*) из *E. coli* [*Tong et al*., 2020; *Rodionova et al*., 2021] как транспортера нуклеозидов. Одна из этих публикаций [*Rodionova et al.,* 2021], обосновывает для PunC функцию транспорта аденозина и других пуриновых нуклеозидов внутрь, тогда как другая [*Tong et al*. 2021] свидетельствует об обратной функции белка, а именно экскреции аденозина из клетки. Эти работы наглядно показывают, актуальность исследований в области транспорта нуклеозидов у микроорганизмов, включая даже такой хорошо изученный объект, как *E. coli*.

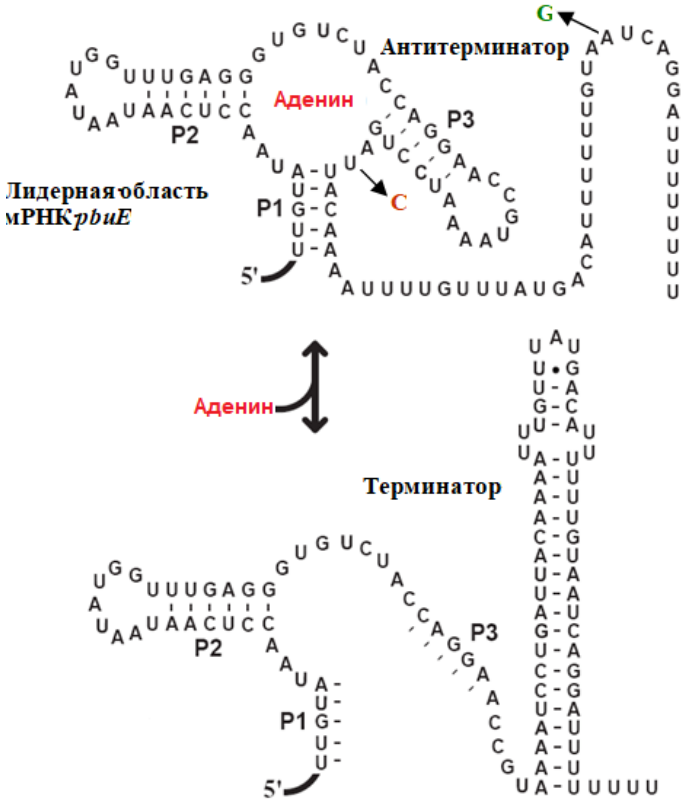


Рис. 23. Схема работы рибопереключателя A-бокс гена *pbuE B. subtilis*: 1) (вверху) в присутствии аденина терминирующая шпилька не формируется, происходит сквозная транскрипция гена *pbuE*, 2) (внизу) в отсутствие аденина формируется терминирующая шпилька, транскрипция гена не происходит. P1, P2 и P3, шпилечные структуры; стрелками показаны замены нуклеотидов U70→C и A100→G (приведено по [Лобанов и др., 2007])

К моменту начала данной работы, выброс целевого продукта из клеток штаммов-продуцентов бактерий не рассматривался как узкое место в метаболических путях. Однако благодаря полученным нами данным о функции экспортеров аминокислот, стало очевидно, что эффективный выброс целевого соединения из клетки позволяет снизить как негативную регуляцию его синтеза (ретроингибирование), так и его общую токсичность для клетки, и, таким образом, значительно усилить не только накопление (выход) целевого продукта, но и продуктивность клеток штаммов-продуцентов. Поэтому поиск генов, продукты которых участвуют в выбросе пуриновых нуклеозидов из клеток, является актуальным не только с научной, но и с практической точки зрения. Поиску и характеристике генов экспортеров нуклеозидов у представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *E. coli*, будет посвящен раздел 4.2.4 главы «Результаты и обсуждение» настоящей работы.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Химические вещества и ферменты

Если не указанно иное, в работе использовали химические вещества, произведенные «Химмед» (РФ), «Диа-М» (РФ), «Реахим» (РФ), Sigma-Aldrich (США). Ферменты, а также готовые наборы для молекулярно-биологических манипуляций приобретали у Fermentas (Литва), позднее ставшей частью Thermo Scientific (США), а также «Евроген» (Москва), Sigma-Aldrich (США), Qaigen (Германия). Двумерный электрофорез белков проводили с использованием реактивов и оборудования, произведенных Amersham Pharmacia (Великобритания), позднее ставшей частью компании GE Hearlthcare (США).

3.2. Бактериальные штаммы, плазмиды, фаги и олигонуклеотиды

Генотип и происхождение основных штаммов бактерий, плазмид и фагов, использованных в работе, приведены в Таблице 3. Подробные процедуры получения указанных в Таблице 3 штаммов бактерий и плазмид содержатся в публикациях по теме диссертации, список которых приведен в конце диссертации. Основные олигонуклеотиды, использовавшиеся в работе, были сделаны на заказ в компании ЗАО «Синтол» (Москва) и «Евроген» (Москва) и приведены в Таблице 4.

Таблица 3. Характеристика и происхождение основных штаммов бактерий, плазмид и фагов, использованных в работе.

Штаммы бактерий	**Описание**	**Источник**
Escherichia coli		
MG1655	K-12 F^- λ^- *ilvG*$^-$ *rfb*-50 *rph*-1	ВКПМ B 6195
MG1655Mu	MG1655 Mu *c*ts62	Данная работа
TG1	*supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB)* F′ (*traD36 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ* ΔM15)	ВКПМ B 5837
TG1deoD	TG1 *deoD*	Данная работа
TG1Mu	TG1 Mu *c*ts62	Данная работа
BL21(DE3)	λDE3, *ompT*	Novagen
JM109	*endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk–, mk+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB),* F′ (*traD36 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ* ΔM15)	Promega
TOP10	F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15Δ*lacX*74 *recA*1 *araD*139Δ(*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA*1 *nupG* λ-	Invitrogen
JM110	*dam dcm supE44 hsdR17 thi leu thr rpsL lacY galK galT ara tonA tsx Δ (lac-proAB)* F′ (*traD36 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ* ΔM15)	ATCC 47013
FADRadd	*purF purA purR deoD add*	[*Matsui et al.*, 2001]
FADRaddedd	*purF purA purR deoD add edd*, продуцент инозина	Ajinomoto, Co
AJ13732	FADRaddedd *xanA pgi app*, продуцент инозина	Ajinomoto, Co
MC4100	F^- Δ*(argF-lac)U169 rpsL150* (Str^R) *relA1 araD139 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR*	[*Casadaban and Cohen*, 1979]
GS224	MC4100 *deoD*	Данная работа
GS258	MC4100 *deoD* P_{nlpD}-*yicM* Cm^R	Данная работа
GS72	TG1 *deoD gsk-3*	Данная работа
GS262	MC4100, *deoD* Δ*add*::*kan*	Данная работа
Bacillus subtilis		
168	*trpC2*	ВКПМ B1727 [*Kunst et al.*, 1997]

KMBS356	*guaB24* Δ*punA* Δ*purA* Δ*purR*, продуцент инозина	Ajinomoto, Co
KMBS375	Δ*deoD guaB24* Δ*punA* P*pur*1-Δatt Δ*purA* Δ*purR*, продуцент инозина	Ajinomoto, Co
BsΔyutF	168Δ*yutF*	Данная работа
BsΔP	168, содержащий делецию 33 п. н. перед геном *yutD* (ΔP)	Данная работа
BsMTNyutF	168, содержащий транскрипционные слияния области перед *yutF* с геном *lacZ* и P_{spac} с геном *yutF*, Em^R	Данная работа
BsΔPMTNyutF	BsMTNyutF, содержащий делецию ΔP, Em^R	Данная работа
BsMTNΔyutF	BsMTNyutF Δ*yutF*, Em^R	Данная работа
BsA1 to 3 BsB1 to 3	168, содержащий транскрипционное слияние фрагментов *yutDEF* (A1-A3, B1-B3) с беспромоторным *lacZ* в *amyE* локусе, Cm^R	Данная работа
BsC^+	*B. subtilis* 168 $trpC^+$	Данная работа
BsC^+ΔU	BsC^+ ΔyitU	Данная работа
B. subtilis 168 Δ*rib*	*B. subtilis* 168 *ribD::kan*; ауксотроф по рибофлавину, Km^R	ВКПМ B13485
Y25	Штамм-продуцент рибофлавина; содержит мутации *ribO335 ribC1* azg^R ros^R	ВКПМ B9850
Y25ΔU	Y25 Δ*yitU*	Данная работа
BSΔyutF ΔU	BsΔyutF Δ*yitU*	Данная работа
B. amyloliquefaciens		
IAM1523	Штамм дикого типа *B. amyloliquefaciens* K	Токийский университет, Япония
AJ1991	Ade^-, Ile^-, Azg^R, продуцент HxR и GR	ВКПМ B 8994
AJ1991Ppur-yicM	AJ1991 *aprE*::P*pur-yicM*	Данная работа
AJ1991ΔpurH	AJ1991 Δ*purH,* продуцент AICAr	Данная работа
AJ1991purH::spc	AJ1991 содержит *purH*::*spc*, штамм-продуцент AICAr; получен с помощью плазмиды pHY300PLK-purH::Sp	Данная работа
AJ1991pbuE::cat	AJ1991 *pbuE*::*cat*	Данная работа
AJ1991 ΔyitU	AJ1991 ΔyitU	Данная работа
AJΔU	AJ1991purH::spc ΔyitU	Данная работа
Bacillus		
B. cereus B 1274	Штамм дикого типа	ATCC 11778
B. licheniformis	Продуцент бацитрацина	ВКПМ B 1746
B. thuringiensis subsp. *israelensis*	Продуцент токсинов насекомых	ATCC 35646
B. thuringiensis subsp. *kurstaki*	Продуцент токсинов насекомых	ВКПМ B 5156
B. intermedius	Продуцент рибонуклеазы	ВКПМ B 3074
Paenibacillus (ранее *Bacillus*) *polymyxa*	Штамм дикого типа	ВКПМ B 1130
Бактериофаги и фазмиды		
$P1_{Vir}$	Бактериофаг для трансдукции *E. coli*	ВКПМ
Mu *c*ts 62	Mu *c*ts62, термоиндуцибельный бактериофаг	[*Groisman and Casadaban*, 1986]
Mu d5005	Фазмида, Km^R	[*Groisman and Casadaban*, 1986]
E40	Бактериофаг для трансдукции *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*	[*Jomantas et al*., 1991, ВКПМ]
Плазмиды		
pMW118	Малокопийный вектор для *E. coli*, Amp^R	Ajinomoto, Co
pKS1	Челночный вектор на основе pWV01 (репликон pG^+host, Ts,)	[*Shatalin and Neyfakh*, 2005]
pNZT1	Челночный вектор для доставки генетических модификаций (репликон pG^+host, Ts, Em^R). pKS1 обработан *Eco*32I и лигирован на себя	Данная работа
pNZTM1	Челночный вектор, содержит маркер для контрселекции; pNZT1 со вставкой кассеты Pspac-$PheS_{BS\ T255S/A309G}$-TargF, Ts, Em^R	Данная работа
pNZTM2	pNZT1 со вставкой кассеты Pspac-$PheS_{BS\ A309G}$-TargF, Ts, Em^R	Данная работа

pNZTM3	pNZT1 со вставкой кассеты Pspac-PheS$_{Eco\ T251S/A294G}$-TargF, Ts, Em^R	Данная работа
pNZT1-PRSBA	pNZT1 со вставкой фрагмента, содержащего регуляторную область и кодирующую рамку гена *prs* дикого типа из *B. amyloliquefaciens*	Данная работа
pNZT1-PRSBA58	pNZT1 со вставкой фрагмента, содержащего регуляторную область и кодирующую рамку гена *prs* с мутацией D58H (gat to cat) из *B. amyloliquefaciens*	Данная работа
pNZT1-PRSBA120	pNZT1 со вставкой фрагмента, содержащего регуляторную область и кодирующую рамку гена *prs* с мутацией N120S (aac to agc) из *B. amyloliquefaciens*	Данная работа
pNZT1-PRSBA135	pNZT1 со вставкой фрагмента, содержащего регуляторную область и кодирующую рамку гена *prs* с мутацией L135I (tta to ata) из *B. amyloliquefaciens*	Данная работа
pNZT1-ΔyitU$_{Bs}$	Плазмида на основе pNZT1 для получения ΔyitU$_{Bs}$	Данная работа
pNZT1-ΔyitU$_{Ba}$	Плазмида на основе pNZT1 для получения ΔyitU$_{Ba}$	Данная работа
pNZT1-ΔyutF	Плазмида на основе pNZT1 для получения Δ*yutF*	Данная работа
pNZT1-ΔP	Плазмида на основе pNZT1 для получения делеции промотора перед *yutD*	Данная работа
pMWAL1	Малокопийный челночный экспрессионный вектор на основе плазмиды pBS72, Amp^R (*E. coli*), Cm^R (*B. subtilis*)	Данная работа
pMWAL1-Prep	pMWAL1 с *repAB* промотором (P$_{rep}$) из плазмиды pLF1311 [*Aleshin et al*., 1999a]; Amp^R (*E. coli*), Cm^R (*B. subtilis*)	Данная работа
pMWAL1-Prep-yutF	pMWAL1-Prep с *yutF* под контролем промотора P$_{rep}$	Данная работа
pMW118-26	pMW118 с *Eco*RI фрагментом (3771 п. н.) хромосомы *B. amyloliquefaciens*	Данная работа
pMW118-34	pMW118 с *Eco*RI фрагментом (4358 п. н.) хромосомы *B. subtilis* 168	Данная работа
pMWAL1-yitU$_{Ba}$	pMWAL1 с *yitU$_{Ba}$* под контролем собственного промотора	Данная работа
pMWAL1-yitU$_{Bs}$	pMWAL1 с *yitU$_{Bs}$* под контролем собственного промотора	Данная работа
pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$	pMWAL1, содержащий промоторную область и SD-область гена *yitU* из *B. amyloliquefaciens* и структурную часть гена *yitU* из *B. subtilis* 168	Данная работа
pET15-yitU$_{Bs}$	Производный pET-15b для экспрессии *yitU* из *B. subtilis* 168	Данная работа
pET15-H6-yitU$_{Bs}$	Производный pET-15b для экспрессии 6-гистидин меченного (H6) гена *yitU* из *B. subtilis* 168	Данная работа
pET15-H6-yutF	Производный pET-15b для экспрессии YutF	Данная работа
pMUTIN2	Интегративный вектор для *B. subtilis*; Pspac *lacZ lacI*; Amp^R (*E. coli*), Em^R (*B. subtilis*)	[*Vagner et. al*., 1998]
pMUTIN2-yutF	Производный pMUTIN2, содержит *B. subtilis yutF*	Данная работа
pDG268	Вектор для интеграции транскрипционного слияния с *lacZ* геном в *amyE* локус хромосомы *B. subtilis*, Amp^R (*E. coli*), Cm^R (*B. subtilis*)	[*Antoniewski et. al*., 1990]
pA1-3, pB1-3	Производные pDG268 содержат различные фрагменты *yutDEF* транскрипционно-слитые с *lacZ*	Данная работа
pA1	Фрагмент от -1070 до -503 (по отношению к старту трансляции *yutF*)	Данная работа
pA2	-1070 to +56	Данная работа
pA3	-1070 to +281	Данная работа
pB1	-778 to -503	Данная работа
pB2	-778 to +56	Данная работа
pB3	-778 to +281	Данная работа
pHY300PLK	Челночный вектор, Amp^R Tc^R	TaKaRa
pMUTIN4	Интегративный вектор для *B. subtilis*; Pspac *lacZ lacI*; Amp^R (*E. coli*), Em^R (*B. subtilis*)	[*Vagner et al*., 1998]
pMUTIN4-purE	Вектор pMUTIN4 со вставкой по сайтам *Hin*dIII-*Bam*HI фрагмента *purE* из генома *B. subtilis* (позиции -43 - +445)	Данная работа
pOK12	Km^R	[*Vieira and Messing*, 1991]
pOK12-Met	Фрагмент ДНК, содержащий гены *bamHII*/*mtbP* и *ydiO*/*bamHI* из *B. amyloliquefaciens* клонирован по сайтам *Sac*I-*Pst*I в pOK12	Данная работа

pUC21	Amp^R	[*Vieira and Messing*, 1991]
pMWKQ	*purF*$^+$ (K326Q) Km^R	[*Matsui et al.*, 2001]
pMWKQAmp	*purF*$^+$ (K326Q) Amp^R	Лабораторная коллекция
pLF22	Многокопийный челночный вектор, Cm^R	[*Тараканов и др.*, 2004]
pYICM1	pOK12, содержащий ген *yicM*	Данная работа
pYICM-CTG	pYICM1, содержащий замену G на C в первом потенциальном стартовом кодоне *yicM*	Данная работа
pYICM-ATC1	pYICM1, содержащий замену G на C во втором потенциальном стартовом кодоне *yicM*	Данная работа
pYICM-ATC2	pYICM1, содержащий замену G на C в третьем потенциальном стартовом кодоне *yicM*	Данная работа
pMW118	Amp^R	Ajinomoto, Co
pMW-att-Cm	pMW118, содержащий ген устойчивости к хлорамфениколу между att сайтами фага λ, Cm^R, Amp^R	Лабораторная коллекция
pMW-att-Km	pMW118, содержащий ген устойчивости к канамицину между att сайтами фага λ, Km^R, Amp^R	Лабораторная коллекция
pMC1871	Вектор для клонирования, Tc^R	[*Shapira et al.*, 1983]
pMWF	pWM-att-Km, содержащий структурную часть гена *lacZ* из плазмиды pMC1871, Km^R, Amp^R	Данная работа
pMWF-P_{yicM}	pMWF, содержащий регуляторную область гена *nepI (yicM),* Km^R, Amp^R	Данная работа
pMWF-deoP3	pMWF, содержащий промотор deoP3, сайт инициации трансляции и 16 первых аминокислотных остатков гена *deoB* в рамке с репортерным геном *lacZ* без нескольких N-концевых а. о.	Данная работа
pMWMX1	Низкокопийный челночный вектор на основе pMW118, Amp^R, Em^R	Данная работа
pYDHL1	pMW118, содержащий *pbuE* из *B. subtilis* 168 ($pbuE_{BS}$)	Данная работа
pYDHL2	pMW118, содержащий *pbuE* из IAM1523 ($pbuE_{BA}$)	Данная работа
pYDHL5	pYDHL2 содержащий $pbuE_{BA}$ с T→C мутацией в регуляторной области	Данная работа
pYDHL4	pMWMX1, содержащий ген $pbuE_{BA}$	Данная работа
pYDHL6	pMWMX1, содержащий $pbuE_{BA}$ с T→C мутацией в регуляторной области ($pbuE_{T\rightarrow C}$)	Данная работа
pET15b(+)	Экспрессионный вектор для *E. col,* Amp^R	Novagen
pET15-PRS	Экспрессионная плазмида для получения белка PRS_{Ba} дикого типа	Данная работа
pET15-PRS58	Экспрессионная плазмида для получения белка PRS_{BaD58H}	Данная работа
pET15-PRS120	Экспрессионная плазмида для получения белка $PRS_{BaN120S}$	Данная работа
pET15-PRS135	Экспрессионная плазмида для получения белка $PRS_{BaL135I}$	Данная работа
pAYCTER3	Amp^R	Лабораторная коллекция

Примечания: Ts – термочувствительный по репликации; устойчивости: Amp^R – к ампициллину; Km^R – к канамицину. Tc^R – к тетрациклину; Cm^R - к хлорамфениколу; Sm^R – к стрептомицину; Spc^R – к спектиномицину; Azg^R– к 8-азагуанину; ауксотрофности: Ade^-– по аденину; Ile^-– по изолейцину; ВКПМ, Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов, ATCC, American Type Culture Collection.

Таблица 4. Олигонуклеотиды (праймеры), использованные в работе.

Название	**Последовательность (5'→3')**
BamHII_f	ggtacccgggagctcgaattcgaaaaggagggtatttattggaactaaac
BamHII_r	aattgatcttttaaatggaatctcaactatgtacttgaggtaatcg
mtbP_f	tacctcaagtacatagttgagattccatttaaaagatcaattttatttagag
mtbP_r	tataggaaatatattctctgttattcagattctttattatcgtatgtatg
ydiO_f	ataataaagaatctgaataacagagaatatatttcctataagcagaaag
ydiO_r	tctgtagacctatagtctacttattctaaatctaataattcatttttaag
BamHI_f	aattattagatttagaataagtagactataggtctacagactataag
BamHI_r	gacgtcgacgcgtctgcagatccaatgacatttatgtagtgtttg
Pspac(+)	gggtatacgtgcaccccagtccagactattcggcac
Pspac(-)	cattttgcatcctccttgtgcacaattgttatccgctcacaattccac
PheS-BS(+)	gagcggataacaattgtgcacaaggaggatgcaaaatggaagaaaag
BS-255(-)	ctactgaaggctccgaaaacgggaagaag
BS-255(+)	cttcttcccgttttcggagccttcagtag
BS-309(-)	cccattccgaagccgaagccctgatattc
BS-309(+)	gaatatcagggcttcggcttcggaatggg
PheS-BS(-)	ttgtaaagaagagctttcagttacgcctgtttaaactgcgaaataaatc
PheS-Eco(+)	gtgcacaaggaggatgcaaaatgtcacatctcgcagaactggttg
Eco-251(-)	ctgcagaaggttcagaaaacgggaagtagg
Eco-251(+)	ttcctacttcccgttttctgaaccttctgc
Eco-294(-)	catccccatcccgaacccgaaaccagagta
Eco-294(+)	agtttactctggtttcgggttcgggatggg
PheS-Eco(-)	ttgtaaagaagagctttcagttatttaaactgtttgaggaaacgc
TargF-BS(+)	cgcagtttaaacaggcgtaactgaaagctcttctttacaaacagg
TargF-Eco(+)	gtttcctcaaacagtttaaataactgaaagctcttctttacaaac
TargF-	gaccaattgtatactgctgtcccatgtcatttcc
BamH+	gtcaagctttatcaggaggtactatg
5-BamHIR	cttaattgagcgttttgacataccggtgaaggtttttgaggttgctgg
3+BamHIR	ccagcaacctcaaaaaccttcaccggtatgtcaaaacgctcaattaag
BamH-	tcactgcaggattcgcttcac
test+BamH	cagaaaaaaaacgcaatattatacacc
test–Bam	gagcagtttaaaggtatgattgacaag
(+)gcaD	gcgaaactgttgccgctt
(−)ctc	ggaggaaggattgaagccac
(+)prsBASalI	gtcgtcgaccctcacactgagatag
(−)prsBAPvuII	tatcagctgattagaacaatacccac
(+)mutBA58	gtattcgcggctgtcattgctacatcatccagtc
(−)mutBA58	gactggatgatgtagcaatgacagccgcgaatac
(+)mutBA120	ggcaaaacttttgcaagcctgcttgaaacagcggg
(−)mutBA120	cccgctgtttcaagcaggcttgcaaaaagttttgcc
(+)mutBA135	aatcgcacttgatatacacgcgccgcaaattc
(−)mutBA135	gaatttgcggcgcgtgtatatcaagtgcgatt
(+)gcatest	cacctgacgcacgtatcggac
(−)ctctest	tctttgactcctttcgcctctc
(+)testBA58w	agaagaaagtattcgcggctgag
(+)testBA58m	agaagaaagtattcgcggctgac
(−)testBA120w	cgctcccgctgtttcaagcagtt
(−)testBA120m	cgctcccgctgtttcaagcagtc
(−)testBA135w	accttgaatttgcggcgcgtgtga
(−)testBA135m	accttgaatttgcggcgcgtgtgt
(+)prsBSSalI	gtagtcgactcggtagtcaatcacagtaaa
(−)prsBS	ccgtttttcactccaatggcttctc
(+)prsBS	cattggcagccgtacggtt
(+)mutBS120	aacttttcgctagcctgcttgaaacagccggtgcgac
(−)mutBS120	gtttcaagcaggctagcgaaaagtttagctgtgattgg
(+)mutBS135	gcacttgacatacatgcgccgcaaattcaagg
(−)mutBS135	cgcatgtatgtcaagtgcaatcacacgagtcg
(+)testBS120w	atcacagctaaacttttcgctga

(+)testBS120m	atcacagctaaacttttcgctgg
(−)testBS135w	cttgaatttgcggcgcatcc
(−)testBS135m	cttgaatttgcggcgcatct
(+)H6−prsNcoI	ataccatgggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggctctaacgaatacggagataagaatttaaagat
(−)H6−prsXhoI	aacctcgagtttagctgaataaatagctgacagattgtt
Mu-R	gcatttatcgtgaaacgctttcg
Mu-L	aatccaatgtcctcccggttttt
CTG-f	cgtgaacgtcttatccagccgacaggtcagg
CTG-r	cctgacctgtcggctggataagacgttcacg
ATC1-f	gccgaccactttaagattgaaatgtgtgacg
ATC1-r	cgtcacacatttcaatcttaaagtggtcggc
ATC2-f	ggcaataaattcactgatggtgttacccgtggc
ATC2-r	gccacgggtaacaccatcagtgaatttattgcc
YICM-tr	atccgcgccgcggttttcggca
YICM1	cccctgaaacatgccacgggtaacaccatgagtgaacgctcaagttagtataaaaaagctgaac
YICM2	caactactgaccaacgcttctttacctgatatcaggtgaagcctgctttttatactaagttgg
YICM3	catcgtcgacatgagtgaatttattgccgaaaacc
YICM4	gcctctagatatcaggatttcttcattttcacc
ADD1	tgtttttataatggtgcgcacttttatatccagaaatgaagcctgctttttatactaagttgg
ADD2	tttgttacttcgcggcgacttttctcgcagtgcgccgctcaag-ttagtataaaaaagctgaac
yicM-pLF1	aaacaaaagctttagaaggtggggaacagaatgagtgaatt-tattgccgaa
yicM-pLF2	acctgatatcaggatttcttca
lacZ_Xba	aatctagacccggggatcccgtcgt
lacZ_BglII	aaagatctcccccctgcccggttatt-3'
PyicM-Xba	tatctagaacagaacctgctgcaatggc
PyicM-Sma	acccgggatccgcgccgcggttttc
deoP3_Sma	tcccgggtgtagcgccgatgccgaat
deoP3_Xba	aatctagaatcgattacagcgtcggcttt
(+)yutFs_SalI	tatgtcgacggaacgatgtacaatgg
(-)yutFs_del	cagtcagagagtcaatggcgtcgtatgtaatggaacggtcg
(+)yutFs_del	cgaccgttccattacatacgacgccattgactctctgactg
(+)yutFs_PstI	ttctgcagaaaaaatatcatccg
(+)yutFs_XhoI	aaactcgagatcatctggcgtttttgtcattc
(-)yutFs_Pdel	cctctttttttcactcattccctaaagaataaatcatgcgatttggc
(+)yutFs_Pdel	cctctttttttcactcattccctaaagaataaatcatgcgatttggc
(-)yutFs_HindIII	aaaaaagcttcgattaacagatggcctatacgc
(+)yutFs_XbaI	aatctagaactggaaagccacaggagtg
(-)yutFs_SmaI	ttcccgggtacctttttagatgacatcgtcg
(+)yutFs_NcoI	ttaccatgggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcaaaacatataaagggtatttaattgatttagacg
(-)yutFs_XhoI	gatcctcgagtcaaatgtatggaatccattcagtc
BsA	ttgaattcttttgatagcggacatagcc
BsB	aagaattcaaaaagaggtgagatcatgattc
BsC	cgcgaattctaggacctgtttccgcgtt
Bs1	taggatccttcaagacaaaatacgcacagc
Bs2	taggatccgtgccattgtacatc
Bs3	cgcggatcctccccaatcacatacaca
(-)yitU Xba Bs	gtggggtctagaaaggtttatgagtggg
(+)yitU Sac Bs	cagcgagctcttctccccgttccc
(+)yitU Nco Bs	gagctttccatggagacaaaaccc
(-)yitU BHI Bs	aggatccttctttaaagtgagaaatattc
(+)yitU His Bs	taccatgggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcgagacaaaaccctatttaatcgc
(+)trpC Hind Bs	ctggcaagcttgaatcggtttatc
(-)trpCw splc	gaagagaatcaataataaaatcttttctaagtacag
(-)trpC Pst Bs	gataactgcagctcgcgccccatg
(+)trpCw splc	ctgtacttagaaaagattttattattgattctcttc
(-)trpC seq1	tcactccctaaacaaagcatgg
(+)trpC wtst Bs	gattcctgtacttagaaaagattttattatcg
(+)yitU delR Bs	gagcttttcatggagacaaaacccgaatatttctcactttaaagaaggtccg
(-)yitU seq1 Bs	ggcggaaaatctcaagcagg

(-)yitU delL Bs	cggaccttctttaaagtgagaaatattcgggttttgtctccatgaaaagctc
(+)yitU seq1 Bs	catatgcagtcaaagcgccaag
(-)yitU Xba Bs	gtggggtctagaaaggtttatgagtggg
(+)PBam yitUBs	acagcaaatcataaaggagttatttatggagacaaaaccctatttaatcg
(+)yitU seq1 Bam	gatcggaaaaaggctgaaaacg
(-)yitUBs PBam	cgattaaataggggttttgtctccataaataactccttttatgatttgctgt
yitU+Xba	tagtctagatgagtcgtctgttttagtatgg
yitV-Sma	agccccgggtcaacgacctgctcc
(+)yitU Sal Bam	ctgacgtcgactttgacccaatc
(-)yitU del L Bam	ggagaaataggatgttaaaaatgcgaaggcgatgagataaggttttgtc
(-)yitU Pst Bam	tgcatctgcagaattggcgtacgc
(+)yitU delR Bam	gacaaaaccttatctcatcgccttcgcatttttaacatcctatttctcc
P24	cgcctcgccgaatttctcatc
P25	aagggaattctttcggcggtgcggctc
punA-Xho	catctcgagcggaagcgatcgcaattc
punA-Pst	catctgcagtgcatctcgcacggattg
deoD1-Xho	atactcgagagagctggccgctgacaat
deoD1-Hind	agctaagcttcccgtaaatccgtacattcc
deoD1-Sma	tacccgggttggcgctgcatactgtatc
deoD1-Bcu	tgactagtgcaagccccgtctgatgtt

3.3. Основные методы конструирования штаммов

Для инактивации хромосомных генов *E. coli* использовали методику на основе λ Red системы [*Datsenko and Wanner*, 2000] с некоторыми модификациями [*Doroshenko et al.*, 2007]. Инактивацию генов в хромосоме осуществляли путем делеции структурной части гена или путем встраивания генов устойчивости к антибиотикам. Если не указано иное, для введения мутаций (делеций, вставок, точечных мутаций) в хромосому *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* использовали плазмиду pNZT1 или pNZTM1 и метод двухстадийного замещения аллелей рекомбинацией, разработанный в данной работе и изложенный в разделе 4.1. главы «Результаты и обсуждение». Для изучения влияния сверхэкспрессии генов, в штаммы вносили мутации, повышающие экспрессию генов, или экспрессионные плазмиды, несущие эти гены.

3.4. Среды и культивирование, условия микробной ферментации

Культивирование. Клетки *E. coli* и *Bacillus* выращивали в минимальной среде Лурия-Бертани (LB) или M9 [*Miller*, 1972] с добавлением D-глюкозы (0,4% для *E. coli* или 2% для *Bacillus*). При необходимости в среды также добавляли тиамин HCl (5 мкг $мл^{-1}$), аминокислоты (40 мкг $мл^{-1}$), пуриновые основания (50 мкг $мл^{-1}$) или эритромицин (200 мкг $мл^{-1}$ для *E. coli* или 5 мкг $мл^{-1}$ для штаммов *Bacillus*). Твердую среду получали добавлением к жидкой среде 20 г $л^{-1}$ агара.

Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) различных соединений, культуры, выращенные в течение ночи в минимальной среде с необходимыми добавками и антибиотиками (в случае плазмидных штаммов), разводили в той же среде и 10^4

клеток высевали на чашки с различными концентрациями ингибиторов роста. Рост оценивали через 48 часов. Каждый эксперимент проводили не менее 3 раз.

Ингибирование роста клеток, опосредованное кассетами Pspac-PheS*-TargF, в присутствии 4-хлор-DL-фенилаланина (4CP) проверяли на агаризованных чашках LB и минимальной средой M9. Для этого культуры клеток, выращенные в LB с эритромицином до OD600 ~ 1,0, разбавляли в 10 раз физиологическим раствором и 5 мкл каждой культуры помещали на чашки, содержащие эритромицин и различные концентрации 4CP.

Для проведения гало-теста на продукцию рибофлавина штаммы ауксотрофы по рибофлавину *B. subtilis* 168 Δ*rib* и штаммы BsC^+ и BsΔyutF, содержащие плазмиды pMWAL1, pMWAL1-yitU$_{Bs}$, pMWAL1-yitU$_{Ba}$ и pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$ выращивали на твердой среде M9 с необходимыми добавками, собирали биомассу и суспендировали в стерильном физиологическом растворе. Штамм *B. subtilis* 168 Δ*rib* разводили в физиологическом растворе до OD_{600} ~0,1, штаммы BsC^+ и BsΔyutF до OD_{600} ~1. Суспензию клеток *B. subtilis* 168 Δ*rib* (0,3 мл, OD_{600} ~0,1) высевали шпателем на чашки со средой M9 без рибофлавина, суспензию штаммов BsC^+ и Bs168ΔyutF (OD_{600} ~1) наносили в виде капель (5 мкл) поверх газона *B. subtilis* 168 Δ*rib*. Чашки инкубировали 16 ч при 37 °C и фотографировали появившееся гало роста штамма-ауксотрофа вокруг тех штаммов, которые выделяли рибофлавин в среду.

Проведение микробной ферментации

Накопление биомассы, потребление глюкозы и продукцию пуриновых нуклеозидов штаммами-продуцентами *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* и *E. coli* исследовали с использованием ферментации в пробирках. Клетки культивировали при 34 °C в течение 18 ч в среде LB. Затем 0,3 мл полученной посевной культуры инокулировали в 2,7 мл ферментационной среды в пробирке 20×200 мм и инкубировали до полного расходования глюкозы на роторной качалке при 30 °C для производных AJ1991 и при 34 °C для производных KMBS375, а также продуцентов *E. coli*.

Ферментационная среда для *B. amyloliquefaciens* содержала следующие компоненты (на литр): 60,0 г глюкозы (если не указано иное), 15,0 г NH_4Cl, 1,0 г KH_2PO_4, 0,4 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 г $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,8 г (по количеству азота) гидролизата соевого шрота (Ajinomoto Co, Inc.), 0,3 г аденина и 25 г $CaCO_3$.

Ферментационная среда для *B. subtilis* содержала следующие компоненты (на литр): 30,0 г глюкозы, 32,0 г NH_4Cl, 1,0 г KH_2PO_4, 0,4 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 г $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,3 г DL-метионина, 1,35 г (по количеству азота) гидролизата соевой муки, 0,1 г аденина, 0,05 г гуанина и 25 г $CaCO_3$. Глюкозу и $CaCO_3$ стерилизовали отдельно. pH доводили до 6,5 перед стерилизацией.

Ферментационная среда для штаммов-продуцентов *E. coli* содержала следующие компоненты (на литр): 40,0 г глюкозы, 16,0 г $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 г KH_2PO_4, 1,0 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 г $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 8 г дрожжевого экстракта и 30 г $CaCO_3$.

3.5. Манипуляции с ДНК

Манипуляции с ДНК проводились согласно стандартным процедурам [*Sambrook and Russell,* 2001] и рекомендациям производителей ферментов и наборов. Плазмидную и хромосомную ДНК выделяли с помощью наборов Qiagen, Miniprep и набора для очистки ДНК, соответственно. ПЦР-амплификации проводили с ДНК-полимеразой Pfu (Thermo Fisher Scientific) для клонирования ДНК и сайт-направленного мутагенеза, и с ДНК-полимеразой Taq (Thermo Fisher Scientific) для анализа колоний с помощью ПЦР. Последовательности всех конструкций, полученных с помощью ПЦР, и всех модификаций целевой хромосомы были подтверждены секвенированием ДНК с использованием соответствующих олигонуклеотидов. Сиквенирование проводилось в сторонней организации с помощью автоматического секвенатора ABI Prizm 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Клонирование фрагментов ДНК *in vivo* проводили с использованием фазмиды Mu d5005 по методике, описанной ранее [*Groisman and Casadaban,* 1986]. Фазмида Mu d5005 представляет собой комбинацию температурочувствительного варианта умеренного фага-транспозона Mu и плазмидного репликона. При 30 °C она поддерживается в виде плазмиды (15-20 плазмид на клетку), а при 42 °C (в присутствии фага-помощника Mucts) выполняет функции фага, захватывая и пакуя вместе с фаговой ДНК участки хромосомы штамма-хозяина. Размер вставок при этом варьирует от 4000 до 30000 п. н. В качестве бактериального донора хромосом использовали штамм MG1655, лизогенный по Mu *c*ts62. Клетки, содержащие подходящие фазмиды, отбирали на среде M9 с канамицином (40 мкг $мл^{-1}$) и соответствующим селективным агентом.

Клонирование фрагментов ДНК *in vitro* проводили по стандартными методикам, наработку необходимых фрагментов осуществляли с помощью ПЦР-амплификации и соответствующих олигонуклеотидов (Таблица 4), для сборки нескольких фрагментов в один использовали модифицированный метод OE-PCR (Overlap extension PCR) [*Ho et al.,* 1989].

Выявление точечных мутаций на хромосоме с помощью ПЦР проводили с помощью двух пар специально подобранных праймеров, разработанным в ходе данной работы (раздел 4.1.2. главы «Результаты и обсуждение»). Небольшой объем клеток из отдельной колонии помещали в пробирку типа Эппендорф объемом 0,2 мл, содержащую 12 мкл реакционной смеси для ПЦР (1× буфер для ПЦР, 0,25 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, 2,5 мМ $MgCl_2$ и 0,1 мкМ каждого праймера в ddH_2O) и 0,5 единиц Taq ДНК-полимеразы. ПЦР проводили в

термоциклере GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). Программа амплификации состояла из 4 мин при 94 °С, 25 циклов по 30 с при 94 °С, 30 с при температуре, подходящей для отжига соответствующей пары олигонуклеотидов и 1 мин при 72 °С на каждую 1 т. п. н. амплифицированного продукта. Затем следовала заключительная 5-минутная стадия достройки при 72 °С. Продукты ПЦР (по 4 мкл каждый) анализировали электрофорезом в 1% (мас./об.) агарозном геле.

Сайт-направленный мутагенез проводили с использованием набора QuikChange® Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), следуя рекомендациям к нему.

Определение точки старта транскрипции подробно описано в публикациях по теме данной работы. Определение проводили с помощью метода «удлинения олигонуклеотидной затравки» (primer extension). Праймер радиоактивно метили γ-[^{33}P]ATP (6000 Ci мМ$^{-1}$) при помощи Т4 полинуклеотид киназы (Pharmacia), фермент инактивировали нагреванием при 95 ºС в течение 5 мин. Обратную транскрипцию проводили с помощью обратной транскриптазы (Qiagen). Синтезированную кДНК осаждали двумя объемами этанола, растворяли в деионизированной воде, денатурировали при 65 ^{o}С в течение 10 мин. и анализировали при помощи электрофореза в 6% акриламидном геле. Радиоавтограф геля получали с помощью прибора Typhoon 9210 imager (Amersham) и программного обеспечения Quant version 5.2 (Molecular Dynamics).

3.6. Введение в клетки генетического материала

Трансформацию *B. subtilis* 168 проводили с использованием ранее описанного стандартного метода [*Anagnostopoulos and Spizizen,* 1961].

Для проведения трансдукции у *Bacillus* получали фаголизаты Е40 [*Jomantas et al.*, 1991] на клетках *B. subtilis* 168, содержащих плазмиды. Верхний (мягкий) агар состоял из 0,01 М $CaCl_2$ и 0,4% (мас./об.) агара (Difco). Нижний (твердый) агар содержал 10 г л$^{-1}$ пептона, 1 г л$^{-1}$ дрожжевого экстракта, 20 г л$^{-1}$ NaCl и 12 г л$^{-1}$ агара. Буфер для разведения фага содержал 0,05 М трис-HCl (pH 7,5), 0,1 М NaCl и 0,01 М $MgCl_2$. Раствор металлов для абсорбции фага состоял из 0,3 М цитрата натрия, 0,1 М $MgSO_4$, 0,05 М $ZnSO_4$, 0,05 М $MnCl_4$ и 0,01 М $FeCl_3$. Непосредственно перед процедурой трансдукции лизат фага обрабатывали УФ-светом для инактивации примерно 90% бляшкообразующих единиц. Клетки-реципиенты выращивали в аэробных условиях в жидкой среде LB до поздней экспоненциальной фазы и затем смешивали с ослабленным лизатом фага, $CaCl_2$ (в конечной концентрации 10 мМ) и разбавленным (1:200) раствором металлов. Инфицированные бактерии инкубировали при 30 °С в течение 2,5 часов, высевали на агаризованный LB с эритромицином и инкубировали при 30 °С в течение 36-48 часов.

Для проведения трансдукции у *E. coli* использовали бактериофаг P1-vir и описанную ранее методику [*Miller*, 1972].

Методика электротрансформации (электропорации) штаммов *B. amyloliquefaciens*, разработанная в ходе данной работы:

1. Вырастить ночную культуру в LBS (LB с добавкой 12,5 мг $л^{-1}$ аденина, 50 мг $л^{-1}$ гуанина и 0,5 М сорбита) на роторной качалке при 34 °С.
2. Развести ночную культуру 1:12,5 свежей LBS (5 мл).
3. Культивировать на роторной качалке при 32 °С 3-3,5 часа.
4. Охладить культуру на ледяной бане в течение 10 мин.
5. Центрифугировать 10 мин при 4 °С и 5000 g.
6. Промыть 3 раза ледяным буфером GLYB (0,5 М сорбита, 0,5 М маннита, 10% глицерина (об./об.), 7,5% бетаина (Sigma, B2629) (мас./об.).
7. Ресуспендировать осадок клеток в ледяном буфере GLYB 1/150 (об./об.) (~ 60 мкл).
8. Поместить клеточную суспензию в морозильную камеру -70 °С (хранение в кельвинаторе увеличивало эффективность электропорации на 30%).
9. Поместить кюветы для электропорации (1 мм) и микроцентрифужные пробирки с клеточной суспензией (-70 °С) в ледяную баню.
10. Разморозить суспензию клеток (60 мкл) на ледяной бане и осторожно перемешать клетки.
11. Добавить 2-4 мкл раствора ДНК (1-2 мкг ДНК), осторожно перемешать и оставить на 1-3 мин на ледяной бане.
12. Перенести смесь клеток и ДНК на дно охлажденной кюветы.
13. Воздействовать на клетки с помощью электропоратора BioRad MicroPulser при напряженности поля 18-21 кВ/см (обычно 4 ~ 6 мс).
14. Сразу же добавить 1 мл предварительно прогретого LBSM (LBS с 0,38 М маннита) в кювету, дважды осторожно перемешать переворачиванием, а затем перенести в чашки Петри диаметром 35 мм.
15. Культивировать клеточную суспензию без перемешивания при необходимой температуре в течение 4 часов.
16. Распределить 200-500 мкл клеток (без центрифугирования) на предварительно нагретую селективную чашку с необходимым антибиотиком.
17. Инкубировать чашки при соответствующей температуре до образования колоний.

3.7. Манипуляции с РНК

Выделение РНК. Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью RNeasy MiniKit (Qiagen), в соответствии с рекомендациями производителя.

3.8. Манипуляции с белками

Экспрессия и очистка белков. Экспрессионными плазмидами, содержащими трансляционное слияние последовательности поли-гистидин и изучаемого белка, а также экспрессионным вектором в качестве контроля, трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3). Культуры полученных трансформантов выращивали в аэробных условиях в среде LB, содержащей ампициллин, при 37 °C до достижения оптической плотности 1,0 при 600 нм, а затем культуры индуцировали 1 мМ изопропил β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG; Fermentas) и выращивали еще 3 часа при 37 °C. Затем 100 мл индуцированных IPTG клеток собирали центрифугированием, дважды промывали 0,9% NaCl, суспендировали в 12 мл буфера A (20 мМ Na_2HPO_4, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 2 мМ PMSF при pH 7,5), разрушали обработкой ультразвуком и центрифугировали при 10 000 × g при 4 °C в течение 20 мин. Очистку белков проводили с помощью металл-аффинной хроматографии (IMAC). Супернатант наносили на колонку HisTrap HP (1 мл) (Pharmacia), уравновешенную буфером A. Белок элюировали постепенно увеличивающимися концентрациями имидазола (от 20 до 500 мМ) в соответствующем буфере с использованием хроматографа ÄKTApurifier (GE Healthcare). Фракции, содержащие белок, объединяли и наносили на колонку Sephadex G-25 (Pharmacia), уравновешенную буфером B (50 мМ фосфата калия при pH 7,5, 15% [об./об.] глицерина), и элюировали тем же буфером. Очищенные рекомбинантные белки разделяли на аликвоты и хранили при -70 °C до тех пор, пока они не потребуются.

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), гель-фильтрацию и оценку белка SDS-PAGE проводили в 5% накопительном геле и 15% разрешающем геле по ранее описанному методу [*Laemmli,* 1970]. После электрофореза полосы белка визуализировали окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим R250.

Эксклюзионную хроматографию для определения молекулярного веса и четвертичной структуры рекомбинантных белков проводили с образцом очищенного фермента с использованием колонки Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences) и хроматографа ÄKTApurifier (GE Healthcare). Колонку уравновешивали и элюировали 50 мМ калий-фосфатным буфером с pH 7,5, содержащим 5 мМ $MgCl_2$ и 0,3 М NaCl, со скоростью потока 0,5 мл/мин при 4 °C. Поглощение выходящего потока контролировали при 215, 260 и 280 нм. Колонку калибровали по стандартам молекулярной массы белков (Sigma): тиреоглобулин (669

кДа), апоферритин (443 кДа), β-амилаза (200 кДа), алкогольдегидрогеназа (150 кДа), бычий сывороточный альбумин (66 кДа) и карбоангидраза (29 кДа). Молекулярную массу белка рассчитывали по объемам элюирования стандартов [*Laurent and Killander*, 1964].

Концентрации белка определяли с помощью анализа белка по методу Брэдфорда [*Bradford*, 1976] с использованием альбумина бычьей сыворотки в качестве стандарта.

3.9. Аналитические методы и определение ферментативных активностей

Концентрации пуриновых соединений в среде культивирования определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ или HPLC – High performance liquid chromatography) с помощью аналитической системы Shimadzu, включающей ультрафиолетовый (УФ) детектор с двойным поглощением. Длина волны была установлена на уровне 250 нм (и 280 нм для сравнения). Разделение проводили при 37 ºС на колонке Inertsil ODS-3 (3×150 мм, 3 мкм) (GL Sciences). Образцы (10 мкл) соответственно разбавленных супернатантов вводили в хроматограф. Подвижная фаза содержала 2% (об./об.) CH_3CN, 0,8% (об./об.) триэтиламина и 0,5% (об./об.) CH_3COOH. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,3 мл/мин.

Концентрацию рибофлавина в среде культивирования определяли 1) методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS – liquid chromatography-tandem mass spectropmetry) с использованием системы Acquity с масс-детектором Xevo TQD (Waters) по ранее описанному методу [*Guo et al*., 2006] с некоторыми модификациями или 2) методом сверхпроизводительной жидкостной хроматографии (UPLC, Ultra-Performance Liquid Chromatography) Acquity system (Waters, USA) с помощью флуоресцентного детектора (Waters Associates, Inc., США). Использовали колонку Nucleosil 100-5 C18 MPN (4×125 mm, 5 μm; Macherey & Nagel) и систему растворителей, 50 mM ацетонитрил, 50 mM муравьиная кислота и формиат аммония (pH 4.3), при скорости потока 0,7 мл/мин: 25% (об./об.).

Концентрации глюкозы определяли ферментативным методом с использованием ферментного электрода (BIOSEN C_line; EKF Diagnostic, Германия).

Бактериальный рост анализировали путем измерения оптической плотности культуральной жидкости (OD600) с использованием спектрофотометра (UV-1800, Shimadzu) при 600 нм. Концентрацию биомассы рассчитывали по значениям OD600 с использованием экспериментально определенного коэффициента корреляции (0,31 г сухой массы клеток *Bacillus* (DW) на литр для OD600, равной 1.

Выходы целевого вещества (продукта), специфичные для глюкозы или биомассы, определяли как отношение общего количества произведенного продукта (г) к потребленной глюкозе (г) или накопленной биомассе (г), соответственно.

Продуктивность (г $л^{-1}$ $ч^{-1}$) рассчитывали, как концентрацию продуцируемых нуклеозидов (г $л^{-1}$ объема культуры), деленную на время ферментации.

3.10. Определение активности и кинетических характеристик ферментов

Измерение активности β-галактозидазы. Для определения уровня экспрессии генов получали трансляционные или транскрипционные слияния (фьюзы) 5'-концевых областей соответствующих генов с геном *lacZ,* кодирующим β-галактозидазу, который содержался в плазмидах pMUTIN4 или pMUTIN2. Измерения и пересчет активности на единицу белка проводили по методу, описанному Миллером [*Miller,* 1972].

Определение активности PRPP-синтетазы. Очищенные рекомбинантные белки PRS разводили в стабилизирующем буфере, содержащем 50 мМ фосфата калия при pH 7,5, 5 мМ $MgCl_2$, 0,03 мМ ATP и 15% (об./об.) глицерина. Для оценки активации Pi белки разводили в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl при pH 7,5, 10 мМ фосфата калия, 5 мМ $MgCl_2$, 0,03 мМ ATP и 15% (об./об.) глицерина. Активность очищенных рекомбинантных белков PRS_{Ba} дикого типа и мутантных измеряли в калий-фосфатном буфере в присутствии $MgCl_2$ и насыщающих концентраций ATP и R5P. $MgCl_2$ присутствовал в более высокой молярной концентрации, чем ATP, поскольку ферменту необходимы как свободные ионы Mg^{2+} в качестве активатора, так и комплекс Mg-ATP в качестве субстрата [*Arnvig et al.,* 1990]. Стандартная реакционная смесь (конечный объем 0,5 мл) содержала 50 мМ калий-фосфатный буфер с pH 7,5, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ATP, 1 мМ R5P, 5 мМ $MgCl_2$ и 0,03 мкг очищенного рекомбинантного белка. После предварительной инкубации всех компонентов, кроме R5P, в течение 2 мин при 37 °C, реакцию инициировали добавлением R5P. Все реакции проводили при 37 ºC в течение 20 мин, так как скорость реакции в этих условиях была линейной. Реакцию останавливали добавлением 0,2 М H_3PO_4 (0,5 мл) с последующим центрифугированием (10000×g, 5 мин, 4 °C). Для каждого образца использовали контрольную реакционную смесь без R5P (накопления AMP в контрольной смеси не обнаружено). Накопление AMP измеряли с помощью HPLC с использованием ранее описанного нерадиоактивного метода [*Koshiishi et al.,* 2001]. HPLC проводили с использованием системы Acquity, поставляемой с фотодиодным матричным детектором 2996 (Waters, США). Образец соответствующим образом разбавляли, вводили в систему HPLC, оснащенную колонкой WAX-1 50 × 4 мм (Shimadzu, Япония), и элюировали при комнатной температуре 50 мМ NaH_2PO_4 (pH 3,3) со скоростью потока 0,5 мл $мин^{-1}$. Поглощение измеряли при 260 нм. Концентрацию накопленного AMP определяли по калибровочной кривой,

полученной при введении стандартных растворов AMP (Sigma). За единицу активности (E) принимали 1 мкмоль AMP, образующийся в минуту в условиях, описанных выше.

Определение общей фосфатазной и фосфодиэстеразной активности. Фосфатазную и фосфодиэстеразную (PDE) активности определяли к хромогенным (*p*NPP, bis-*p*NPP, *p*NPPC) и природным субстратам (2',3'-cAMP, 3',5'-cAMP, 3',5'-cGMP (3',5'-циклический GMP)), соответственно, в присутствии различных ионов двухвалентных металлов (1 мМ $MnCl_2$, 1 мМ $CoCl_2$, 1 мМ $NiSO_4$ или 5 мМ $MgCl_2$ и 10 мкМ $ZnCl_2$) при pH от 5 до 9. Время инкубации реакционной смеси составляло от 5 до 140 минут. Активность по отношению к хромогенным субстратам оценивали спектрофотометрически по образованию *p*NP ($\varepsilon_{410\,nm}$ = 15,460 $M^{-1}cm^{-1}$).

PDE активность очищенного белка (Ht-YueE) по отношению к циклическим субстратам измеряли с помощью количественного анализа, основанного на измерении чувствительного к щелочной фосфатазе нуклеотидного продукта.

$$\mathbf{cNMP + H_2O \xrightarrow{PDE} NMP + H^+ \xrightarrow{\text{щелочная фосфатаза креветки}} nucleoside + P_i}$$

cNMP – cyclic nucleoside monophosphate (циклический нуклеозид монофосфат)
NMP – nucleoside monophosphate (нуклеозид монофосфат)

Реакционные смеси (0,5 мл) содержали 50 мМ трицинового буфера (pH 8,5), 1 мМ $MnCl_2$, 2 мМ субстрата и 20 мкг Ht-YueE_{Bs}. После 60 минут инкубации при температуре 37 °C, добавляли буфер щелочной фосфатазы креветки (0,5 мл 50 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 10 мМ $MgCl_2$) и 5 единиц самой щелочной фосфатазы креветки. Реакцию проводили 30 минут при температуре 37 °C и останавливали добавлением 1 мл реагента C для финального определения фосфата [*Chen et al.*, 1956]. За одну единицу активности (E) принимали 1 нмоль 3'-AMP, образующегося в минуту при 30 ºC.

Определение активности и субстратной специфичности 5'-нуклеотидаз. Фосфатазную активность 5'-нуклеотидаз по отношению к физиологическим субстратам определяли по скорости высвобождения Pi в подходящем буфере в присутствие соответствующего субстрата. Для определения Pi использовали метод *Cariani et al*. [2004] (для кислотолабильных субстратов) или метод *Chen et al*. [1956]. Чтобы исключить влияние неферментативных факторов, параллельно отслеживали фоновый уровень фосфата, используя контрольную реакцию без фермента. Активность фермента рассчитывали, как разность между собственно реакцией и фоновой реакцией неспецифического гидролиза субстрата, который

составлял не более 5% от активности. За одну единицу активности (Е) принимали 1 мкмоль Pi, высвобождаемого в минуту при 30 ºС.

Определение фосфодиэстеразной активности Ht-YueE. Стандартная реакционная смесь (0,2 мл) содержала 50 мМ Трис-HCl, (pH 8,0), 1 мМ $MnCl_2$, 5 мМ 2',3'-cAMP и 0,043 мг/мл Ht-YueE. Реакцию проводили при 30 °С в течение 180 мин и останавливали добавлением 0,2 мл 50% ацетонитрила. Реакцию гидролиза 2',3'-cAMP отслеживали с помощью HPLC, при этом количественно определяли субстрат 2',3'-cAMP и продукты реакции 3'-AMP и 2'-AMP. 2'-AMP детектировался на уровне фоновых реакций, что свидетельствует о гидролизе 2'-связи. Активность оценивали по образовавшемуся 3'-AMP. Для каждой пробы параллельно проводилась фоновая реакция без добавления фермента (контроль). За единицу активности (Е) принимали 1 нмоль 3'-AMP, образующийся в минуту при 30 °С.

Определение кинетических параметров ферментов. Кинетические параметры определяли с помощью соответствующего анализа активности с использованием от пяти до десяти различных концентраций субстрата в подходящем диапазоне. Полученные данные анализировали с использованием графика Лайнуивера-Берка или графика Хилла помощью программы построения нелинейных кривых GraphPad Prism 8. Значения k_{cat} были рассчитаны на основе молекулярной массы одной субъединицы фермента. Все кинетические параметры были получены как средние значения как минимум трех независимых измерений.

3.11. Методы работы *in silico*

В процессе работы **использовали различные базы данных**, NCBI (National Center for Biotechnological Information), https://www.ncbi.nlm.nih.gov/; BioCyc, https://biocyc.org/; UniProt, https://www.uniprot.org/; PDB (Protein Data Bank), https://www.ebi.ac.uk/pdbe/); BRENDA (Braunschweig Enzyme Database); https://www.brenda-enzymes.org/; DBTBS, https://dbtbs.hgc.jp/; SubtiWiki, http://subtiwiki.uni-goettingen.de/ и другие.

Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей **использовали программное обеспечение**: Vector NTI Advance 10, https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html; Clustal (Clustal W, Clustal X или Clustal Omega), http://www.clustal.org/omega/; Signal P, https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0; SOSUI, https://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/mobile/; TMHMM 2.0 (Transmembrane protein topology prediction method based on a hidden Markov model), https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0; PDBePISA

(Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies), https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html; ARNold Finding Terminators, http://rssf.i2bc.paris-saclay.fr/toolbox/arnold/ и т.д.

Статистический анализ. Дисперсионный анализ всех полученных в работе данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 5, https://www.graphpad.com/.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Как было отмечено ранее, штаммы *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* и их близкие родственники, широко используются в фармацевтической и пищевой промышленности, а также в сельском хозяйстве [*Schallmey et al*., 2004; *Abriouel et al*., 2011; *Liu et al*., 2013], поэтому создание продуцентов на их основе является актуальной задачей.

К моменту начала исследований по теме диссертации 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, практически не были описаны. Поэтому разработка удобного инструментария для внесения множественных мутаций в хромосомы этих бактерий методами генной инженерии являлась актуальной задачей.

Важным этапом получения направленных хромосомных мутаций является введение генетического материала в клетки. Хотя ранее в литературе сообщалось о природной трансформации компетентных клеток бацилл, и в частности, некоторых штаммов *B. amyloliquefaciens* [*Coukoulis and Campbell*, 1971; *Chen et al*., 2007a], подавляющее большинство промышленно важных штаммов этого вида характеризуется отсутствием естественной компетенции для поглощения ДНК. 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. Так у *B. subtilis* были описаны системы BsuM, BsuE и BsuF, распознающие последовательности CTCGAG, CGCG и CCGG, соответственно [*Jentsch*, 1983]. Для *B. amyloliquefaciens* была хорошо известна система BamHI [*Brooks et al.*, 1989], однако сложность введения ДНК из клеток других видов в эти бактерии, в том числе и в содержащие делецию в гене *bamHIR*, кодирующем эндонуклеазу рестрикции *Bam*HI, предполагает наличие в клетках *B. amyloliquefaciens* дополнительных систем рестрикции-модификации. Это усложняло применение генно-инженерных подходов к редактированию геномов этих бактерий, и делало методы получения рекомбинантных штаммов относительно 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) (Таблица 3), 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 быть стабильными 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 плазмидной ДНК остается фактором, ограничивающим генетические манипуляции, мы начали эту работу с подбора и оптимизации условий введения генетического материала в клетки *B. amyloliquefaciens* K.

4.1.1. Оптимизация условий введения генетического материала в нетрансформирумые штаммы *Bacillus*

Для введения генетического материала в нетрансформирумые штаммы *B. amyloliquefaciens* можно использовать подход, основанный на применении хорошо трансформируемого штамма *B. subtilis*, например, *B. subtilis* 168, в качестве промежуточного хозяина и трансдукции конечного реципиента бактериофагом E40 [*Jomantas et al*., 1991], которая обеспечивает высокие частоты передачи ДНК от *B. subtilis* к *B. amyloliquefaciens*. Для реализации этого подхода штамм *B. subtilis* 168 должен содержать донорную целевую плазмидную ДНК. Однако *B. subtilis* 168 не является удобным хозяином для конструирования рекомбинантных плазмид, с этой целью гораздо удобнее использовать штаммы *E. coli*, а затем вводить полученные и выделенные из них рекомбинантные плазмиды в клетки *B. subtilis* 168, например, с помощью трансформации компетентных клеток. Эта схема вполне рабочая и широко использовалась в нашей лаборатории для получения рекомбинантных штаммов *B. amyloliquefaciens*. Однако она требует определенных затрат времени, поэтому нами была изучена возможность введения плазмидной ДНК, выделенной из *E. coli*, напрямую в не обладающие природной компетентностью клетки *B. amyloliquefaciens* K методом электротрансформации. В этом методе используется электрическая импульсная обработка клеток, которая вызывает временное разрушение барьера проникновения клеточной мембраны и обеспечивает перенос целевой ДНК в клетки.

К началу данной работы были опубликованы протоколы для проведения электротрансформации для некоторых штаммов бацилл, *B. subtilis* и *B. licheniformis* [*McDonald*

et al., 1995; *Xue et al.*, 1999], которые мы и взяли за основу при оптимизации процесса трансформации модельного штамма-продуцента пуриновых нуклеозидов *B. amyloliquefaciens* AJ1991.

В ходе проведения экспериментов стало понятно, что методика электротрансформации не универсальна, и условия повышения ее эффективности для конкретных штаммов необходимо подбирать индивидуально. Было обнаружено, что наиболее важными являются 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. В результате была разработана методика, описанная в главе «Материалы и методы исследования». 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. Помимо этого, нами было сделано наблюдение, что замораживание и длительное хранение клеток, подготовленных для электротрансформации, при температуре -70 °C также оказывает положительный эффект на количество трансформантов (Рис. 24).

Рис. 24. Влияние замораживания и хранения клеток *B. amyloliquefaciens* K на эффективность электротрансформации. По оси X указано время хранения клеток в кельвинаторе перед процедурой электротрансформации.

Чтобы избежать деградации ДНК в клетке *B. amyloliquefaciens* под действием системы рестрикции-модификации, мы выделяли донорную плазмидную ДНК из клеток штаммов *E. coli*, дефектных по генам собственных ДНК-метилтрансфераз (штамм JM110 (*dam dcm*) или TOP10 (*Δdam Δdcm Δmrr ΔhsdMRS ΔmcrBC ΔmcrA*)) и далее применяли обработку плазмидной ДНК *in vitro* коммерческим препаратом метилтрансферазы *Bam*HI (New England Biolabs).

Кроме того, для получения ДНК, полностью метилированной по типу *B. amyloliquefaciens in vivo*, была сконструирована вспомогательная плазмида pOK12-Met. Для этого в составе вектора pOK12 были клонированы 4 гена ДНК-метилтрансфераз из *B.*

amyloliquefaciens K, выявленных с помощью базы данных ферментов рестрикции-модификации REBASE (http://rebase.neb.com/rebase/). Это гены BAMTA208_16660 (кодирует метилазу BamHI (COG0863), которая узнает последовательность GGATCC); BAMTA208_06525 (кодирует метилазу BamHII (COG0863), которая узнает двуцепочечную последовательность GGATCC, вызывает специфическое метилирование C-5 на обеих цепях и защищает ДНК от расщепления эндонуклеазой BamHI); BAMTA208_06715 (*mtbP*) (кодирует ДНК-цитозин-метилтрансферазу (тип *Hae*III), узнает последовательность GGCC) и BAMTA208_19835 (*ydiO*) (кодирует ДНК-цитозин-метилтрансферазу второго типа (COG0270) и узнает последовательность GCWGC).

Для защиты донорной плазмидной ДНК от деградации в клетке *B. amyloliquefaciens* ее выделяли из клеток штамма JM110 (TOP10), содержащих также плазмиду pOK12-Met, получая таким образом метилирование целевой плазмидной ДНК по типу *B. amyloliquefaciens in vivo*. Этот подход позволил почти на порядок увеличить количество трансформантов по сравнению с метилированием *in vitro* (Таблица 5).

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 5). 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 5).

Таблица 5. Частоты электротрансформации клеток различных видов бацилл.

Штамм-реципиент	**Количество трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК, выделенной из клеток *E. coli***
B. amyloliquefaciens AJ1991	$1\times10^{3*}$ (3×10^{2})
B. cereus B 1274 (ATCC 11778)	6×10^{3}
B. licheniformis B 1746	4×10^{3}
B. thuringiensis subsp. *israelensis* ATCC 35646	8×10^{3}
B. thuringiensis subsp. *kurstaki* B 5156	8×10^{3}
B. intermedius B 3074	2×10^{4}

Примечания: звездочкой отмечена частота электротрансформации с использованием плазмидной ДНК, выделенной из клеток, содержащих pOK12-Met; в скобках – обработанной *Bam*HI метилтрансферазой *in vitro*.

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

Хотя, как было отмечено в предыдущем разделе, оптимизированный для *B. amyloliquefaciens* K протокол электротрансформации позволял надежно вводить плазмидную ДНК для введения целевых генетических модификаций в хромосому (далее «плазмида для доставки») 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.

Для работы с грамположительными бактериями из литературы были известны два термочувствительных репликона, pE194^{ts} и pG^{+}host. Сообщалось о внесении безмаркерных делеций в некоторые гены *B. amyloliquefaciens* путем замены аллелей с использованием термочувствительной плазмиды pE194^{ts}, однако частоты отбора рекомбинантных клонов были довольно низкими (от 0,1 до 1%), что приводило к необходимости использовать фенотипический отбор для обнаружения мутантов [*Vehmaanperä et al.*, 1991]. Кроме того, встраивание плазмиды pE194^{ts} в хромосому происходит при довольно высокой температуре, 43 °C, и культивирование штаммов-продуцентов в таких стрессовых условиях может привести к нестабильности имеющихся генетических мутаций.

В отличие от pE194^{ts} репликон pG^{+}host [*Biswas et al.*, 1993], который является термочувствительном по репликации производным плазмиды широкого круга хозяев, pWV01 [*Maguin et al.*, 1996], обеспечивал высокую частоту замещающей рекомбинации при относительно невысокой непермиссивной температуре, 37 °C. Biswas et al. показали, что использование плазмиды на основе репликона pG^{+}host для инактивации и замены гена в хромосоме грамположительной бактерии *Lactococcus lactis* позволило увеличить частоту

делеций на два-три порядка и получить замены аллелей с частотой от 1 до 40% даже в отсутствие фенотипического отбора. Этот эффективный аллельный обмен стал возможен благодаря репликации плазмиды по типу катящегося кольца, что обеспечивало очень высокую частоту рекомбинации между хромосомным геном-мишенью и гомологичной последовательностью на плазмиде [*Noirot et al.*, 1987].

Поэтому для разработки метода введения различных генетических модификаций в хромосому *B. amyloliquefaciens* мы использовали репликон pG$^+$host и изучили возможность его применения для отбора рекомбинантных клонов штаммов бацилл в отсутствии фенотипической селекции.

На начальном этапе путем небольшой модификации плазмиды pKS1, которая была получена на основе pG$^+$host репликона и использовалась в штаммах *Bacillus anthracis* для отбора рекомбинантных клонов с применением фенотипической селекции [*Shatalin and Neyfakh*, 2005], мы сконструировали вектор для введения целевых модификаций. Полученный в результате однорепликонный челночный вектор, pNZT1 (Таблица 3), имел небольшой размер (4 т. п. н.), реплицировался в штаммах *E. coli* и *Bacillus* при температурах не выше 30 °C, обеспечивал селекцию клонов, содержащих плазмиду, на средах с эритромицином и имел многочисленные уникальные сайты рестриктаз для клонирования целевых ДНК-фрагментов (Рис. 25, А).

А. **Б.**

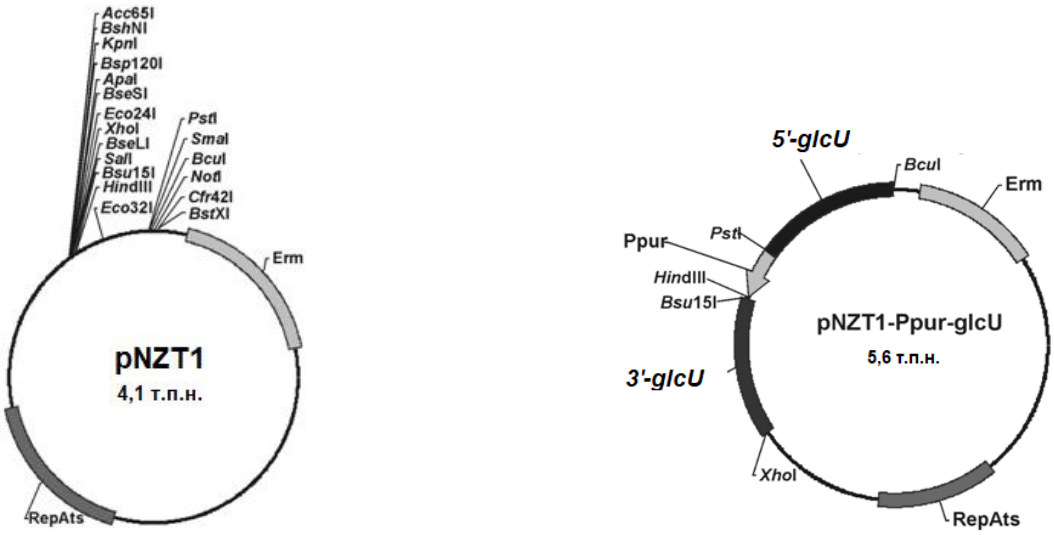


Рис. 25. Схема вектора pNZT1 (**А**) и варианта плазмиды для доставки генетической модификации хромосомы (замены промотора перед геном *glcU*) (**Б**). RepAts, детерминант репликации pG$^+$host; Erm, ген устойчивости к эритромицину; Ppur, промотор оперона *pur* из *B. amyloliquefaciens*; фрагменты 5'-*glcU* и 3'-*glcU* соответствуют фрагментам хромосомной ДНК *B. amyloliquefaciens*, которые локализуются перед промотором гена *glcU* и после него, соответственно.

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 (Рис. 25, Б).

Получение генетических модификаций хромосомы штаммов бацилл схематически изображено на Рис. 26. 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 °C (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 °C 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. 26).

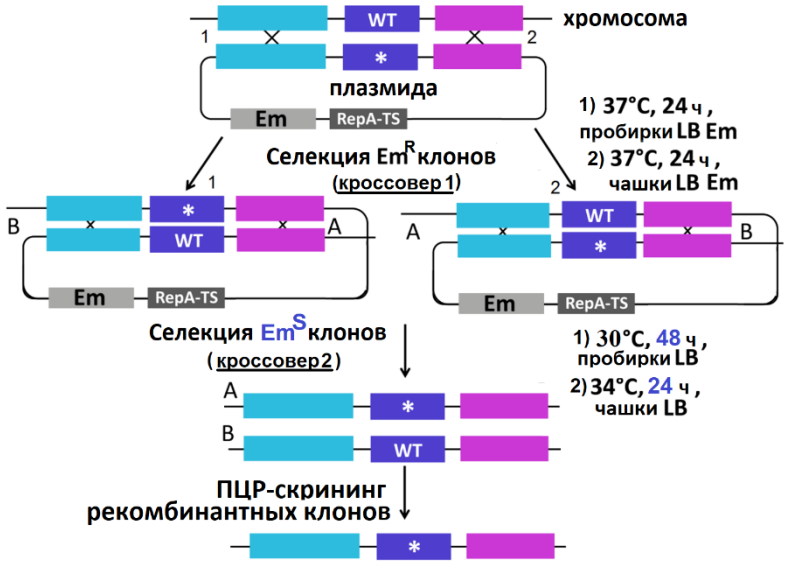


Рис. 26. Схематическое изображение процедуры замещения аллелей методом двухстадийной рекомбинации. Генетическая модификация (делеция, точечная мутация или вставка) показана звездочкой. WT обозначает последовательность дикого типа. Перечеркнутые линии обозначают альтернативные одиночные кроссинговеры (1 или 2 и A или B).

Отбор рекомбинантных клонов проводили с помощью ПЦР-анализа колоний. Делеции и вставки различали по разнице в размерах продуктов ПЦР, как описано ранее [*Janes and Stibitz*, 2006; *Waschkau et al.*, 2008].

Для отбора клонов с точечной мутацией мы предложили специальную методику ПЦР-анализа. Поскольку удлинению праймера Taq ДНК-полимеразой препятствует несовпадение на 3'-конце праймера [*Huang et al.,* 1992], комплементарность 3'-концевого нуклеотида необходима для эффективной амплификации. Мы предположили, что это свойство Taq ДНК-полимеразы, а также специально подобранные праймеры, можно использовать для того, чтобы по количеству образовавшегося ПЦР-продукта различить матрицы, которые отличаются даже всего одним основанием. Так, например, для поиска клонов с заменой T на C в регуляторной области гена *pbuE*, для каждого рекомбинантного клона после выщепления плазмиды выполняли две независимые ПЦР-амплификации с использованием пар праймеров W (test-com/test-w) и M (test-com/test-m), специфичных для *pbuE* дикого типа или для аллеля с мутацией, соответственно (Рис. 27, А). Общий праймер test-com был полностью комплементарен матрице, тогда как test-w и test-m отличались 3'-концевым нуклеотидом (родительский или мутантный) (Рис. 27, Б). 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 различить клоны дикого и мутантного типов (Рис. 27, В). Аналогичным образом в ходе данной работы мы быстро и эффективно отбирали рекомбинантные клоны, содержащие самые разные точечные мутации. 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.

А.

Б.

Пара праймеров	Варианты отжига праймера на матрице		Продукт ПЦР
W (test-com/test-w)	матрица - дикий тип	5′-ga**t**tacaaaaaactgtcccgcacactt-3′	+
	test-w	3′-**AT**TGTTTTTTGACAGGGCGTGTGAA-5′	
	матрица - мутантный тип	5′-ga**c**tacaaaaaactgtcccgcacactt-3′	-
	test-w	3′-**AT**TGTTTTTTGACAGGGCGTGTGAA-5′	
M (test-com/test-m)	матрица - дикий тип	5′-ga**t**tacaaaaaactgtcccgcacactt-3′	-
	test-m	3′-**GT**TGTTTTTTGACAGGGCGTGTGAA-5′	
	матрица - мутантный тип	5′-ga**c**tacaaaaaactgtcccgcacactt-3′	+
	test-m	3′-**GT**TGTTTTTTGACAGGGCGTGTGAA-5′	

В.

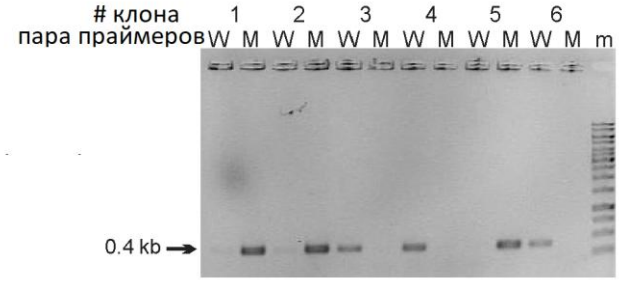


Рис. 27. Скрининг генетических модификаций с помощью ПЦР-анализа колоний. **А.** Схематическое изображение отжига пар праймеров test-com/test-w и test-com/test-m на матрице, мутация отмечена красной звездочкой. **Б.** Изображение отжига праймеров test-w и test-m на матрице хромосомной ДНК дикого типа или мутантного типа в ПЦР-скрининге колоний на мутацию pbuE$_{T\rightarrow C}$. **В.** Показан электрофорез в агарозном (1%) геле продуктов ПЦР (4 мкл), визуализированных путем окрашивания бромидом этидия для поиска клонов с точечной мутацией pbuE$_{T\rightarrow C}$. m: ДНК-маркер 1 т. п. н. (Fermentas). Две независимые ПЦР-амплификации были выполнены для каждой колонии с использованием пар праймеров, комплементарных как *pbuE* дикого типа (**W**=test-com/test-w) и, так и мутантному pbuE$_{T\rightarrow C}$ (**M**=test-com/test-m). Дорожки 1, 2 и 5: клоны, содержащие pbuE$_{T\rightarrow C}$ (продукт ПЦР появляется только при амплификации с парой праймеров M); дорожки 3, 4 и 6: клоны, содержащие *pbuE* дикого типа (продукт ПЦР появляется только при амплификации с парой праймеров W).

Модификация метода замещения аллелей путем применения маркера контрселекции

Известно, что у *E. coli* α-субъединица фенилаланил-тРНК лигазы (синтетазы) PheS, содержащая мутацию A294G (Рис. 28), ошибочно связывает аналог фенилаланина 4CP, который включается в белки во время трансляции вместо фенилаланина, вызывая тем самым гибель клеток [*Kast and Hennecke,* 1991]. Это свойство может быть использовано для отбора клонов, утративших ген *pheS**, кодирующий мутантный фермент, по росту на среде с 4CP. Изначально этот подход использовали для контрселекции в *E. coli*, а затем различные маркеры *pheS** были адаптированы для генной инженерии как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий [*Kristich et al.*, 2007; *Xie et al.*, 2011; *Argov et al.*, 2017; *Zhou et al.*, 2017]. К моменту нашего поиска удобного маркера для контрселекции были опубликованы работы, в которых мутантный ген *pheS** из *B. subtilis*, который кодирует PheS с мутацией A309G ($pheS_{BsA309G}$), соответствующей мутации A294G *E. coli* (Рис. 28), был применен для отбора клонов *Listeria monocytogenes* и *B. amyloliquefaciens* [*Argov et al.*, 2017; *Zhou et al.*, 2017]. Однако маркер $pheS_{BsA309G}$ характеризовался довольно низкой эффективностью отбора, что приводило к необходимости осуществлять отбор на минимальной или полубогатой среде с относительно высокими концентрациями дорогостоящего реактива 4CP (> 5 мМ).

```
                                    *
Eco wt              237  EDLQIRFRPSYFPFTEPSAEVDVM----------GKNGKWLEVLGCGMVHPNVLRNVGI
Eco T251S/A294G     237  EDLQIRFRPSYFPFSEPSAEVDVM----------GKNGKWLEVLGCGMVHPNVLRNVGI
BS  wt              241  QDREIRLRPSFFPFTEPSVEVDVTCFKCGGQGCSVCKKTGWIEILGAGMVHPNVLKMAGF
BS A309G            241  QDREIRLRPSFFPFTEPSVEVDVTCFKCGGQGCSVCKKTGWIEILGAGMVHPNVLKMAGF
BS T255S/A309G      241  QDREIRLRPSFFPFSEPSVEVDVTCFKCGGQGCSVCKKTGWIEILGAGMVHPNVLKMAGF

                              *
Eco wt              286  DPEVYSGFAFGMGMERLTMLRYGVTDLRSFFENDLRFLKQFK--
Eco T251S/A294G     286  DPEVYSGFGFGMGMERLTMLRYGVTDLRSFFENDLRFLKQFK-
BS  wt              301  NPEEYQGFAFGMGVERIAMLKYGIEDIRHFYTNDVRFISQFKQA
BS A309G            301  NPEEYQGFGFGMGVERIAMLKYGIEDIRHFYTNDVRFISQFKQA
BS T255S/A309G      301  NPEEYQGFGFGMGVERIAMLKYGIEDIRHFYTNDVRFISQFKQA
```

Рис. 28. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей С-концевых областей белков PheS с помощью программы CLUSTALW [*Larkin et al.*, 2007]. 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.

Чтобы преодолеть этот недостаток, была поставлена задача усовершенствовать *pheS** маркер. По опубликованным на момент наших исследований данным [*Miyazaki*, 2015] PheS из *E. coli*, содержащий две замены, T251S и A294G ($pheS_{EcoT251S/A294G}$), обладал более высокой эффективностью включения 4CP, чем PheS с единственной заменой A294G. Основываясь на высокой консервативности последовательности PheS среди бактерий, мы предположили, что эффективность отбора маркера $pheS_{BsA309G}$ может быть улучшена путем введения в PheS из

B. subtilis дополнительной мутации, соответствующей T251S в белке PheS из *E. coli*. Выравнивание аминокислотной последовательности белков PheS из *E. coli* и *B. subtilis* выявило треонин в 255-ом положении как мишень для замены (Рис. 28). Чтобы отобрать маркер *pheS** с улучшенной эффективностью контрселекции в *B. amyloliquefaciens*, были сконструированы и протестированы кассеты для экспрессии с промотора Pspac [*Vagner et al.*, 1998] гена *E. coli* $pheS_{EcoT251S/A294G}$ и двух мутантных генов *pheS* из *B. subtilis*, $pheS_{BsA309G}$ и $pheS_{BsT255S/A309G}$ (кодирующие белки PheS, содержащие мутации A309G и A309G/T255S, соответственно). Для предотвращения сквозной транскрипции каждый вариант гена *pheS** фланкировали на 5'-конце rho-независимым терминатором транскрипции гена *argF* из *B. subtilis*. Полученные кассеты Pspac-PheS*-TargF клонировали в термочувствительную по репликации интегративную плазмиду pNZT1, получив, таким образом, плазмиды pNZTM3, pNZTM2 и pNZTM1 (Рис. 29), соответственно. Далее для тестирования маркеров на основе pNZT1, pNZTM3, pNZTM2 и pNZTM1 были сконструированы плазмиды для делетирования гена рестриктазы *bamHI* на хромосоме *B. amyloliquefaciens*, pNZT1-ΔBamHIR, pNZTM3-ΔBamHIR, pNZTM2-ΔBamHIR и pNZTM1-ΔBamHIR (Рис. 29).

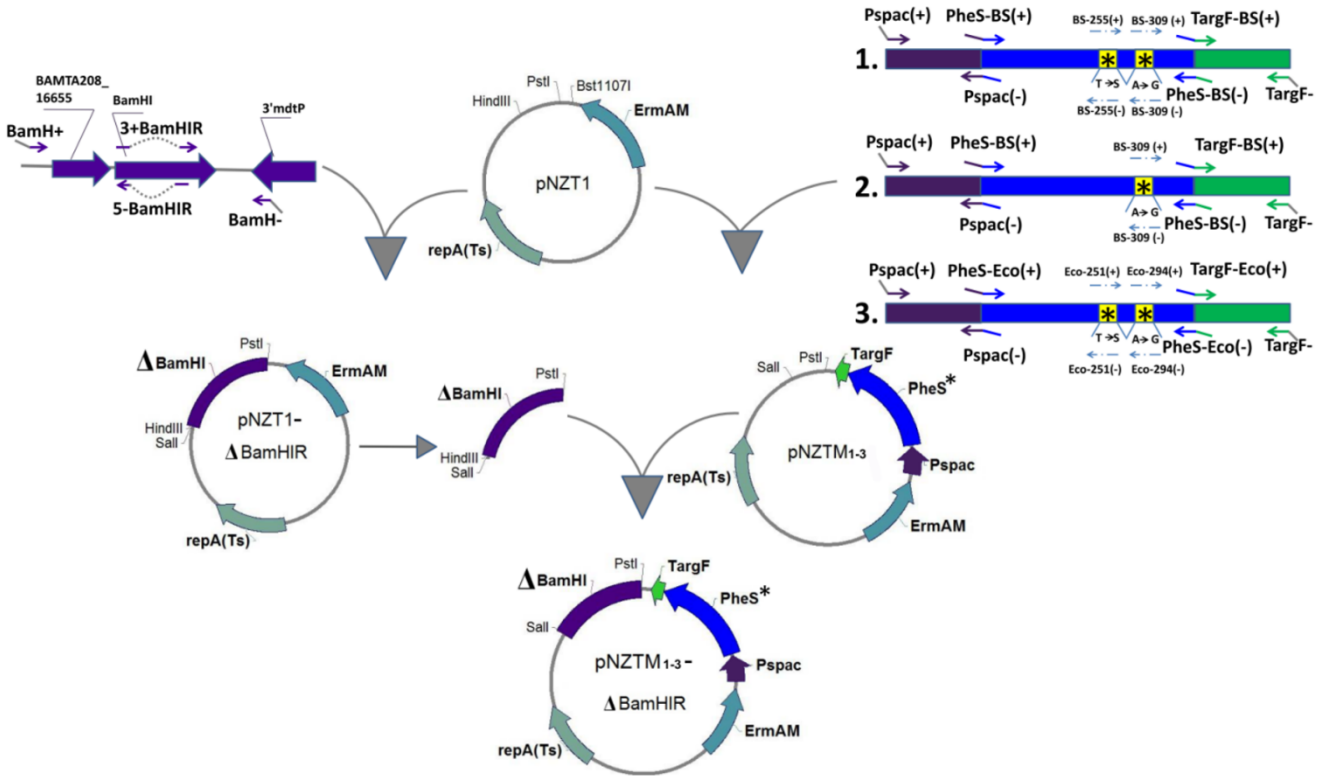


Рис. 29. Схема конструирования векторов pNZTM1, pNZTM2 и pNZTM3 и плазмид на их основе для введения мутации Δ*bamHI*.

Затем каждую из четырех плазмид для доставки делеции *bamHI* в хромосому переносили в штамм *B. amyloliquefaciens* AJ1991ΔpurH путем электротрансформации.

На этом этапе однокроссоверные интегранты, в которых вся плазмида была вставлена в хромосому, были получены непосредственно путем отбора устойчивых к эритромицину трансформантов (Em^R) при непермиссивной температуре 37 °C. Необходимо отметить, что в штамме AJ1991ΔpurH промотор *spac* обеспечивал конститутивную экспрессию генов *pheS** из-за отсутствия репрессора LacI в этом штамме.

Проверка ингибирования роста полученных интегрантов в присутствии 4CP (за счет экспрессии кассеты Pspac-PheS*-TargF) и эритромицина на агаризованных чашках LB и M9 показала, что экспрессия *E. coli* $pheS_{EcoT251S/A294G}$ не вызывала гибели клеток даже при относительно высоких концентрациях 4CP (> 10 мМ) (Рис. 30). Этот результат согласуется с довольно умеренным сходством аминокислотных последовательностей PheS из *E. coli* и *B. amyloliquefaciens* (идентичность 49%), что приводит к неспособности α-субъединицы из *E. coli* конкурировать с нативным ферментом из *B. amyloliquefaciens* при образовании функционального комплекса фенилаланил-тРНК-лигаза у *B. amyloliquefaciens* [*Mermershtain et al.*, 2011]. Среди протестированных маркеров *pheS** из *B. subtilis*, как мы и предполагали, наилучшие характеристики продемонстрировал двойной мутант $pheS_{BsT255S/A309G}$. Этот маркер 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) (Рис. 30).

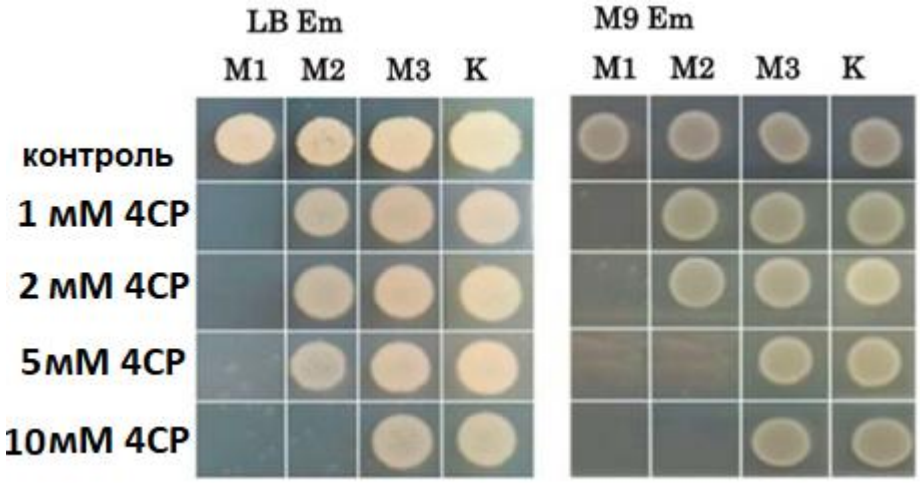


Рис. 30. Подавление роста клеток, опосредованное кассетами Pspac-PheS*-TargF в присутствии 4CP. Ингибирование роста тестировали на чашках с агаром LB или M9 с добавлением эритромицина (обозначены как **LB Em** и **M9 Em**, соответственно) без 4CP (**контроль**) или в присутствии различных концентраций 4CP (от 1 до 10 мМ). Бляшки роста интегрантов в результате одиночного кроссинговера *B. amyloliquefaciens* AJ1991ΔpurH с плазмидами доставки pNZTM1-ΔBamHIR, pNZTM2-ΔBamHIR, pNZTM3-ΔBamHIR и pNZT1-ΔBamHIR обозначены, соответственно, **M1, M2, M3** и **K**.

Высев интегрантов со встроенной плазмидой, содержащей маркер *pheS*$_{BsT255S/A309G}$ (первый кроссинговер), на чашки с LB агаром в присутствии 1 мМ 4CP и последующее культивирование в течение 24 часов позволяло получить около 100% клонов, утративших плазмиду (второй кроссинговер) (Рис. 31). ПЦР-анализ полученных клонов показывал, что около половины из них содержала желаемую мутацию на хромосоме (Рис. 32).

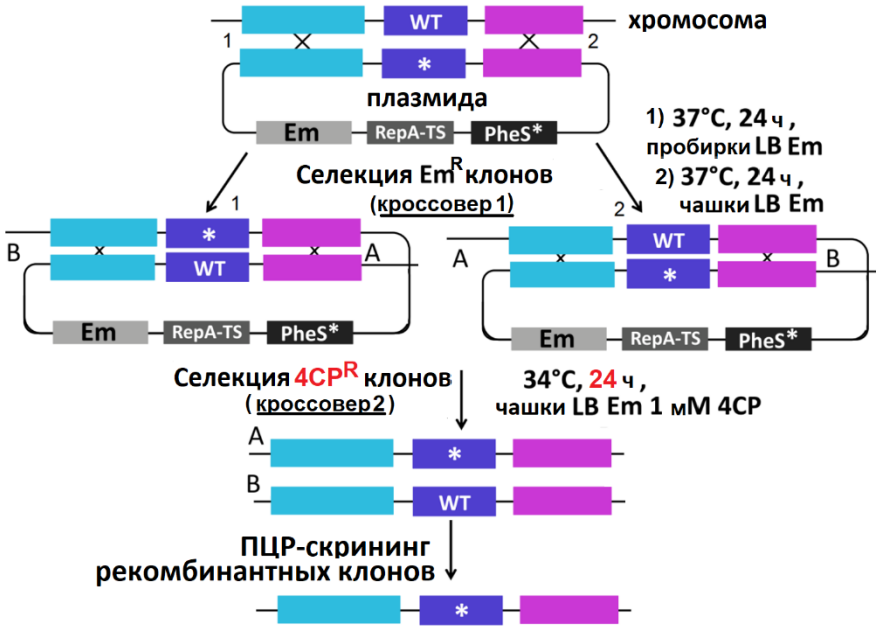


Рис. 31. Схематическое изображение процедуры замещения аллелей методом двухстадийной рекомбинации с применением маркера контрселекции *pheS*$_{BsT255S/A309G}$. Генетическая модификация (делеция, точечная мутация или вставка) показана звездочкой. **WT** обозначает последовательность дикого типа. Перечеркнутые линии обозначают альтернативные одиночные кроссинговеры (**1** или **2** и **A** или **B**).

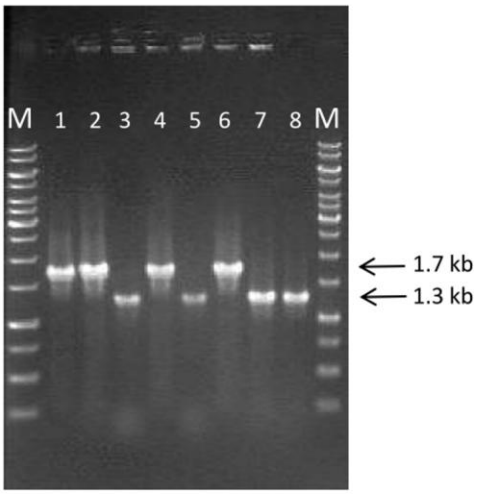


Рис. 32. Скрининг колоний на мутацию Δ*bamHI* с помощью ПЦР-анализа. Электрофорез продуктов ПЦР (8 мкл) в агарозном (1%) геле визуализировали путем окрашивания бромидом этидия. M, ДНК-маркер (Thermo Fisher Scientific). Номера протестированных клонов, показаны вверху. Размеры фрагментов ПЦР указаны справа (1,7 т. п. н. и 1,3 т. п. н. для *bamHI* дикого типа и делеции, соответственно).

Таким образом, на основе *B. subtilis pheS* нами был получен удобный маркер контрселекции *pheS*$_{BsT255S/A309G}$ и применен для генной инженерии *B. amyloliquefaciens*. Благодаря комбинации двух мутаций, T255S и A309G, он обладает в десять раз большей эффективностью отбора, чем ранее применявшийся в *B. amyloliquefaciens* маркер *pheS*$_{BsA309G}$, который содержит единственную мутацию A309G [*Argov et al*., 2017; *Zhou et al*., 2017]. Маркер *pheS*$_{BsT255S/A309G}$ вызывает гибель клеток *B. amyloliquefaciens* при относительно низких концентрациях аналога фенилаланина, 4CP (1 мМ), и его можно успешно использовать для селекции даже на богатой среде.

Используя полученный в результате этой работы новый вектор pNZTM1 и применяя малозатратный как по времени, так и по трудоемкости модифицированный метод замещения аллелей рекомбинацией, мы получили целый ряд немаркированных рекомбинантных штаммов *B. amyloliquefaciens*, несущих целевые делеции генов, а также вставки и точечные мутации. Мы также показали, что *pheS*$_{BsT255S/A309G}$ вызывает чувствительность к 4CP у других видов *Bacillus*, а следовательно, метод может быть использован более широко (Таблица 6).

Таблица 6. Подавление роста различных штаммов *Bacillus* в присутствии 4CP, опосредованное кассетами Pspac-PheS*-TargF.

Штамм	**Плазмида**	**Летальная концентрация 4CP (мМ)**	
		на чашках LB	**на чашках M9**
Bacillus amyloliquefaciens AJ1991ΔpurH	pNZT1	>20	>20
	pNZTM1	1	1
	pNZTM2	10	5
	pNZTM3	>20	>20
Bacillus subtilis 168	pNZT1	>20	>20
	pNZTM1	1	1
	pNZTM2	10	5
	pNZTM3	>20	>20
Bacillus intermedius B 3073	pNZT1	>20	>20
	pNZTM1	2	2
	pNZTM2	10	5
	pNZTM3	>20	>20
Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* ATCC 35646	pNZT1	>20	>20
	pNZTM1	5	2
	pNZTM2	20	5
	pNZTM3	>20	>20

Однако необходимо отметить, что в случае интегрантов полученных от *B. subtilis* 168 (pNZTM1) из 100 устойчивых к 4CP клонов приблизительно 28 клонов все еще содержали плазмиду. Эти «ложноположительные» клоны, скорее всего, возникли из-за гомологичной рекомбинации, которая заменила мутантный ген хромосомным *pheS* дикого типа. Поэтому для

применения этого маркера контрселекции в клетках *B. subtilis* потребуется его дальнейшее усовершенствование.

Выводы из раздела 4.1.

Использование термочувствительной по репликации плазмиды позволило разделить этапы введения плазмиды и гомологичной рекомбинации между участками ДНК на плазмиде и хромосоме, и преодолеть, таким образом, сложности отбора рекомбинантных клонов из-за низкой эффективности введения генетического материала в некоторые штаммы бацилл. Разработанный нами метод позволил вводить различные направленные, немаркированные генетические изменения (делеции, вставки и точечные мутации) в том числе, и в хромосому утративших способность к естественной трансформации штаммов *B. amyloliquefaciens*. Метод позволяет быстро и эффективно получать генетические модификации непосредственно в штамме-продуценте, а значит, не требует конструирования специального предварительного штамма. При этом на хромосоме не остается гетерологичной последовательности, что особенно важно при конструировании штаммов-продуцентов, использующихся для производства пищевых продуктов.

Предложена также вариация этого метода с использованием контрселекции для быстрого отбора рекомбинантных клонов, выщепивших плазмиду, дополнительно сокращающая получение хромосомных мутаций на двое суток. В качестве маркера контрселекции был применен $pheS_{BsT255S/A309G}$, усовершенствованный нами для генной инженерии *B. amyloliquefaciens.*

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 хромосому штаммов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* (включая нетрансформируемые штаммы) были введены многочисленные генетические модификации (делеции и вставки фрагментов ДНК, а также точечные замены нуклеотидов).

Разработанный метод и сконструированные вектора pNZT1 и pNZTM1 нашли свое применение в других лабораториях как нашего института, так и других институтов в нашей стране и за рубежом, о чем свидетельствуют многочисленные публикации, часть из которых приведена в списке:

1. Lobanov K.V., Errais Lopes L., Korol'kova N.V., Tyaglov B.V., Glazunov A.V., Shakulov R.S. et al. (2011). Reconstruction of Purine Metabolism in *Bacillus subtilis* to Obtain the Strain Producer of AICAR: A New Drug with a Wide Range of Therapeutic Applications. Acta Naturae. 3(2):79-89. https://www.doi.org/10.32607/20758251-2011-3-2-79-89
2. Hossain M.J., Ran C., Liu K., Ryu C.M., Rasmussen-Ivey C.R., Williams M.A., et al. (2015). Deciphering the conserved genetic *loci* implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum. Front Plant Sci. 6:631. https://www.doi.org/10.3389/fpls.2015.00631
3. Gao L., Liu H., Ma Z., Han J., Lu Z., Dai C. et al. (2016). Translocation of the thioesterase domain for the redesign of plipastatin synthetase. Sci Rep. 6:38467. https://www.doi.org/10.1038/srep38467
4. Graf N., Wenzel M., Altenbuchner J. (2016). Identification and characterization of the vanillin dehydrogenase YfmT in *Bacillus subtilis* 3NA. Appl Microbiol Biotechnol. 100(8):3511-21. https://www.doi.org/10.1007/s00253-015-7197-6
5. Jiang J., Gao L., Bie X., Lu Z., Liu H., Zhang C. et al. (2016). Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme.* BMC Microbiol. 16:31. https://www.doi.org/10.1186/s12866-016-0645-3
6. Liu X., Yang H., Zheng J., Ye Y., Pan L. (2017). Identification of strong promoters based on the transcriptome of *Bacillus licheniformis*. Biotechnol Lett. 39(6):873-881. https://www.doi.org/10.1007/s10529-017-2304-7
7. Lapashina A.S., Feniouk B.A. (2019). Mutation Q259L in subunit beta in Bacillus subtilis ATP synthase attenuates ADP-inhibition and decreases fitness in mixed cultures. Biochem Biophys Res Commun. 509(1):102-107. https://www.doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.075
8. Li Y., Wang H., Zhang L., Ding Z., Xu S., Gu Z. et al. (2020). Efficient Genome Editing in *Bacillus licheniformis* Mediated by a Conditional CRISPR/Cas9 System. *Microorganisms.* 8(5):754. https://doi.org/10.3390/microorganisms8050754
9. Yang T., Shi Y., Yang Q., Xin Y., Gu Z., Zhang L. (2021). A Novel Regulator Participating in Nitrogen Removal Process of *Bacillus subtilis* JD-014. Int J Mol Sci. 22(12):6543. https://www.doi.org/10.3390/ijms22126543
10. Sun J., Liu Y., Lin F., Lu Z., Lu Y. (2021). CodY, ComA, DegU and Spo0A controlling lipopeptides biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* fmbJ. J Appl Microbiol. 131(3):1289-1304. https://www.doi.org/10.1111/jam.15007

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

Как было изложено в главе «Обзор литературы», пуриновые нуклеозиды, инозин и гуанозин, а также их фосфорилированные производные, IMP и GMP, соответственно, широко применяются в качестве вкусовых добавок в пищевой технологии, а также в качестве лекарственных препаратов и добавок в фармацевтической промышленности. В настоящее время эти соединения получают с помощью ферментации, то есть процесса культивирования соответствующих штаммов-продуцентов в аппаратах с целью получения целевого продукта. В промышленном производстве IMP и GMP используются как штаммы-продуценты рода *Corynebacterium*, способные транспортировать из клетки фосфорилированные формы пуринов, так и штаммы-продуценты рода *Bacillus*, экскретирующие только продукты дефосфорилирования нуклеотидов – нуклеозиды инозин и гуанозин, которые далее в производственном цикле могут быть фосфорилированы до IMP и GMP с помощью ферментов – фосфатаз [*Mihara et al*., 2000] или химическим способом.

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 (8-азагуанин, тиогуанин и 8-азаксантин), аналог глютамина сульфоксид метионина и другие. Так, штамм AJ1991, накапливающий одновременно инозин и гуанозин, был отобран с помощью нескольких этапов мутагенеза с применением химической обработки и УФ-облучения и содержит мутации, обеспечивающие сверхсинтез IMP и GMP *de novo*. Это мутация в гене *purA*, блокирующая конверсию IMP в SAMP (см. Рис. 13) и придающая ауксотрофность по аденину, а также мутация устойчивости к пуриновому аналогу 8-азагуанину, вызывающая дерепрессию биосинтеза IMP [*Ishii and Shiio,* 1972], скорее всего, за счет снятия ретроингибирования фермента глутамин-PRPP-амидотрансферазы (PurF). Необходимо упомянуть, что AJ1991 был сначала описан как штамм *B. subtilis* G-1136A [*Shiro et al.,* 1965], а позже идентифицирован нами как штамм *B. amyloliquefaciens*.

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 развитию удобного метода для введения генно-инженерных модификаций, описанного в предыдущем разделе.

Поиску подходов метаболической инженерии для дальнейшего совершенствования метаболизма бацилл с целью создания более эффективных продуцентов инозина и гуанозина, а

также AICAr и рибофлавина, будут посвящены последующие разделы этой диссертационной работы.

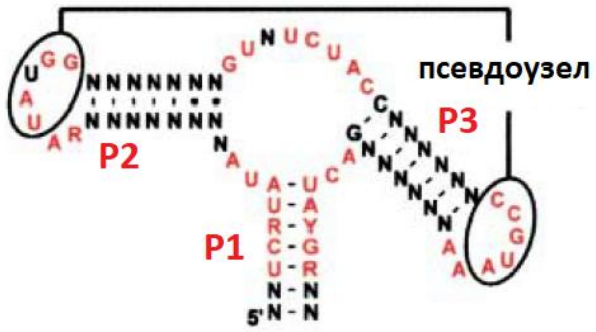
4.2.1. Снятие негативной регуляции экспрессии генов пуринового оперона

За биосинтез пуриновых соединений *de novo* отвечают гены, объединенные у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* в оперон *purEKBCSQLFMNHD* [*Ebbole and Zalkin*, 1987]. Известно, что экспрессия *pur*-оперона подвержена двойной отрицательной негативной регуляции с участием белка-репрессора PurR [*Zalkin*, 1993] и аттенюатора транскрипции или рибопереключателя, так называемого G-бокса, расположенного в лидерной последовательности пуринового оперона [*Johansen et al*., 2003]. Механизмы этой регуляции подробно изложены разделе «Обзор литературы».

Логично было предположить, что освобождение транскрипции *pur*-оперона от негативной регуляции может привести к сверхсинтезу IMP и его метаболических производных, инозина и гуанозина. Поэтому мы изучили влияние нескольких мутаций, направленных на снятие этой двойной регуляции и усиление транскрипции оперона. Это – а) делеция участка рибопереключателя, отвечающего в присутствии гуанина за образование терминирующей транскрипцию *pur*-оперона шпильки (мутация Δatt); б) мутации в -10 последовательности промотора оперона, taAGat→taTAat, меняющие последовательность до консенсусной, характерной для «сильных» SigA-промоторов (мутация Ppur_{-10}); а также в) мутации, нарушающие связывание белка-репрессора PurR (мутации Δ*purR* или $purE_{\text{PurBoxmut}}$) (Рис. 33).

Влияние замены в -10 области промотора, делеции последовательности аттенуатора в G-боксе и делеции гена репрессора пуринового оперона *purR* на уровень экспрессии пуринового оперона были исследованы совместно с коллегами из Ajinomoto Co., Inc. на примере модельных продуцентов нуклеозидов *B. subtilis*. С этой целью была сконструирована плазмида pMUTIN4-purE, содержащая ДНК-фрагмент первого гена пуринового оперона, *purE* (позиции -43 - +445), для встраивания плазмиды в хромосому путем гомологичной рекомбинации с образованием транскрипционного слияния регуляторной области пуринового оперона и репортерного гена *lacZ*. Этой плазмидой трансформировали штамм *B. subtilis* 168 (*purR*$^+$ *trpC2*), а также сконструированные штаммы, которые содержали делецию гена репрессора PurR (*purR*::spc) и либо регуляторную область *pur*-оперона дикого типа (KMBS4 (*B. subtilis* 168 *purR*::*spc trpC2*)), либо эту область, содержащую одну из мутаций: консенсусную последовательность -10 области промотора (KMBS283 (Ppur_{-10} *purR*::*spc trpC2*)), делецию аттенуатора (KMBS286 (Δatt *purR*::*spc trpC2*)) или комбинацию этих двух мутаций (KMBS287 (Ppur_{-10} Δatt *purR*::*spc trpC2*)).

А.



Б.

purE_B.su

PurBox1 PurBox2 -35 -10

ttgatctaaaacacGaacattagtagaatgaatttttgtatcgttcgataatatcgttgacattatccatgtccgttgttaAGataaacatgaaatcaaaa
cacgacctcatataatcttgggaatatggcccataagtttctaccggcaaccgtaaattgccggactatgcaggaaagtgatcgataaaactgacatg
gatatatcgcagaagcgaacgactgacgatacatgtaccatgcccggtttgtattgcttcctcataagtgcaatgcagagcgggtatttTttattttctga
aaacaaaagcattagaaggtggggaacagaATG

purE_B.am

PurBox1 PurBox2 -35 -10

ttgatctaaacacGaacattaaaagaaagaatttttatatcgttcgataatgtcgttgacattatccaagtccgttgttaAGataaacatgaaatcaaaa
cacgacctcatataatcttgggaatatggcccataagtttctaccggctgccgtaaacggccggactatgcaggaaagtgataaacagctgacatg
gatatcgcagaagcgaacgactgccgatacgcgccatgcccggtttgtattgcttcctcatagtgcaatacgagccgggctttttttctgaaaaacaa
agcatgagaaggtgggaacagaATG

Рис. 33. **А**. Консенсусная последовательность и вторичная модель для домена РНК G-бокса. Показано формирование шпилек P1, P2 и P3. Обведенные в кружки нуклеотиды демонстрируют комплементацию оснований, которая может указывать на образование псевдоузла. **Б**. Нуклеотидные последовательности 5'-нетранслируемой области *pur*-оперона и элементы регуляции его экспрессии у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. Сайты связывания для репрессорного белка PurR подсвечены желтым, -35; -10 области сайта связывания для РНК-полимеразы заключены в черные прямоугольники. Нуклеотиды, которые обеспечивают образование шпилек P1, P2, P3, и терминаторной шпильки, показаны оранжевыми, синими, фиолетовыми и зелеными буквами, соответственно. Позиции оснований, в которых получали мутации, показаны красным, делетированные нуклеотиды в лидерной области *pur*-оперона (Δatt) подчеркнуты. Жирными заглавными буквами показан стартовый кодон. Заглавное Т жирным шрифтом в последовательности *purE_B.su* указывает начало ДНК фрагмента, встроенного в вектор pMUTIN4-purE.

В отобранных рекомбинантных штаммах, KMBS292 (*purE*::pMUTIN4 *trpC2*), KMBS295 (*purE*::pMUTIN4 *purR*::spc *trpC2*), KMBS296 (P*pur*$_{-10}$ *purE*::pMUTIN4 *purR*::*spc trpC2*), KMBS299 (Δatt *purE*::pMUTIN4 *purR*::*spc trpC2*) и KMBS300 (P*pur*$_{-10}$ Δatt *purE*::pMUTIN4 *purR*::*spc trpC2*), плазмида pMUTIN4-purE была интегрирована в хромосому с образованием транскрипционных слияний P*pur-lacZ,* P*pur*$_{-10}$*-lacZ,* P*pur*Δatt *-lacZ* и P*pur*$_{-10}$Δatt-*lacZ,* соответственно (Рис. 34).

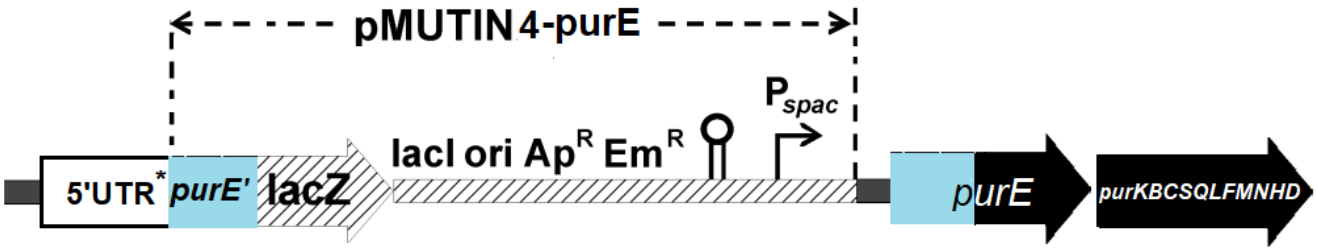


Рис. 34. Схематическое изображение области *purE* у сконструированных штаммов *B. subtilis*, содержащих pMUTIN4-purE. Обозначения: 5'UTR, 5' нетранслируемая область перед *purE* геном; звездочкой обозначены варианты этой последовательности: дикий тип (P*pur)*, консенсусная последовательность -10 области промотора (P*pur*$_{-10}$), делеция аттенуатора (Δatt) или комбинация этих двух мутаций (P*pur*$_{-10}$ Δatt). Голубым цветом показан фрагмент ДНК, по которому проходила гомологичная рекомбинация между плазмидой и хромосомой, завершившаяся встраиванием плазмиды в хромосому.

Уровни экспрессии генов пуринового оперона под контролем разных регуляторных элементов оценивали по уровню активности β-галактозидазы (Рис. 35).

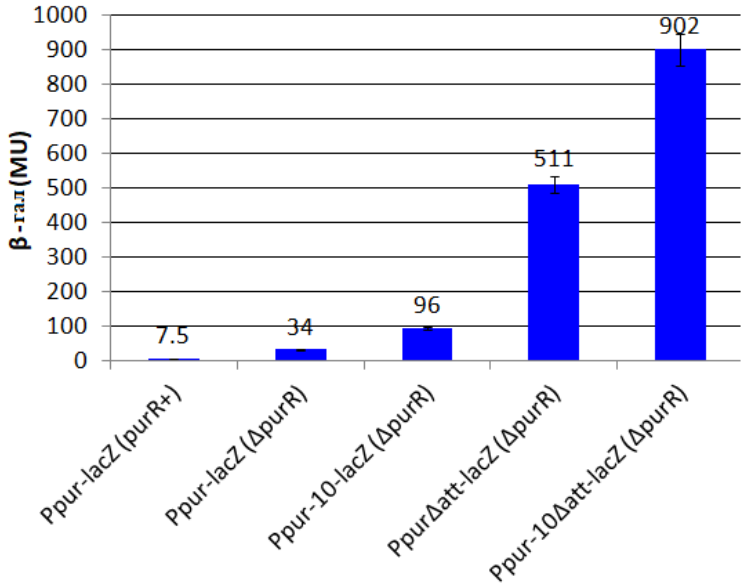


Рис. 35. Активность β-галактозидазы (**β-гал (MU**)), выраженная в единицах Миллера и отражающая уровень экспрессии репортерного гена *lacZ* в штаммах с указанным по горизонтальной оси генотипом регуляторной области *purE* и статуса гена *purR* (Δ*purR=purR::spc*). Значения представляют собой усредненные данные как минимум трех независимых экспериментов, планки погрешностей указывают на стандартные отклонения.

Инактивация гена *purR* повышает уровень экспрессии репортерного гена в 4,5 раза. В штамме *purR*::*spc* замена taAGat→taTAat в -10 области сайта связывания для РНК-полимеразы (P*pur*$_{-10}$), создающая консенсусную последовательность, и мутация Δatt увеличивают экспрессию репортерного гена в 2,8 и 15 раз, соответственно. Объединение этих мутаций имеет синергический эффект, повышая уровень экспрессии в 26,5 раза. 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 P*pur*$_{-10}$ 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 *pupG*)). По сравнению с родительским штаммом, полученный штамм KMBS365 (KMBS356 P*pur*$_{-10}$ Δatt), накапливал значительно больше инозина и гипоксантина в культуральной жидкости в процессе ферментации в пробирках (Рис 36). Таким образом, одновременное введение двух мутаций, делеции аттенуаторного участка рибопереключателя 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.

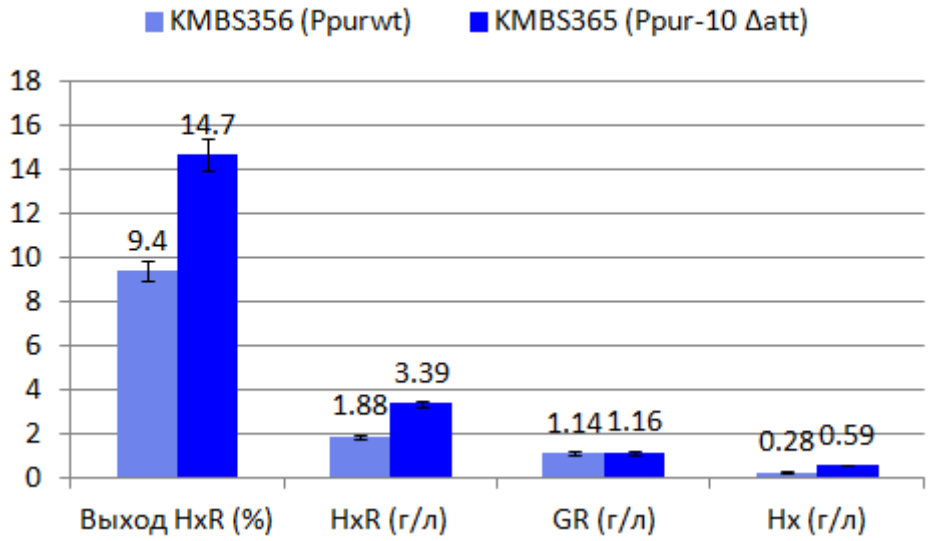


Рис. 36. Эффект мутаций в регуляторной области пуринового оперона на накопление пуриновых соединений и выход инозина (отношение количества образовавшегося продукта на количество затраченной глюкозы (г/г, выражен в процентах). Значения представляют собой усредненные данные как минимум трех независимых экспериментов, планки погрешностей указывают на стандартные отклонения.

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*$_{\text{PurBoxmut}}$) (см. рис. 33, Б).

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. Стоит упомянуть, что хронологически делеция аттенуаторного участка *pur*-оперона в продуценте гуанозина была первой генно-инженерной модификацией промышленных штаммов-продуцентов нуклеозидов, полученной нами еще в начале 2000-х до разработки удобного инструментария, описанного в предыдущем разделе. Поэтому изначально для ее введения потребовалось очень трудоемкие и времязатратные операции, такие как 1) получение прототрофного штамма *purA*$^+$ на основе штамма-продуцента; 2) введение в него делеции *purE::Km* с помощью плазмиды доставки этой мутации на основе pHY300PLK (плазмиду вводили трансдукцией фагом Е40, используя для этого промежуточный хозяин); последующая длительная селекция рекомбинантных клонов и элиминация плазмиды путем многочисленных пересевов культуры; 3) замещение аллеля *purE::Km* на PpurΔatt-purE$^+$ по той же схеме, но используя для доставки не термочувствительную по репликации плазмиду pHY300PLK-PpurΔatt-purE$^+$ и фенотипическую селекцию для отбора хромосомных рекомбинантов (отбирали по чувствительности к антибиотикам и росту без гипоксантина), и наконец, 4) восстановление ауксотрофности по аденину в полученном штамме. Таким образом, на отбор необходимых клонов потребовалось несколько месяцев. Позднее, благодаря разработанному в ходе этой работы методу двухстадийного замещения аллелей с помощью рекомбинации (см. раздел 4.1), введение подобной делеции в целевые штаммы осуществлялась в течение нескольких дней.

Выводы из раздела 4.2.1.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что нарушение негативной регуляции путём удаления последовательности в 5'-нетранслируемой области первого гена пуринового оперона, отвечающей за образование терминаторной шпильки гуанинового рибопереключателя, а также мутация taAGat→taTAat в -10 области промотора этого оперона, и, в большей степени, комбинация этих двух мутаций увеличивают уровень экспрессии пуринового оперона. Эти генетические модификации при ведении их в хромосому приводят к почти двухкратному росту накопления пуриновых нуклеозидов в соответствующих штаммах-продуцентах на основе бацилл.

4.2.2. Снятие ретроингибирования PRPP-синтетазы

На следующем этапе работы мы исследовали возможность увеличения накопления пуриновых нуклеозидов за счет усиления биосинтеза одного из основных предшественников биосинтеза пуринов, PRPP. Как было описано в разделе «Обзор литературы», 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 (см. Рис. 13). Синтез PRPP из R5P и ATP 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 ATP 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 фосфатом и аллостерическое ингибирование ее нуклеотидами ADP и GDP указывает на зависимость биосинтеза PRPP от величины «энергетического заряда» клетки (соотношения ATP/ADP) и уровня биосинтеза пуриновых нуклеотидов.

Продукт PRPP-синтетазы, 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 (EC 2.4.2.14). Этот фермент, кодируемый геном *purF*, ингибируется пуриновыми нуклеотидами по принципу обратной связи, при этом наиболее эффективным ингибитором является AMP (см. Рис. 15). Было показано, что увеличение пула PRPP значительно снижает ингибирование глутамин-PRPP-амидотрансферазы, опосредованное AMP [*Meyer and Switzer*, 1979]. С другой стороны, PRPP связывает репрессор PurR и дерепрессирует PurR-регулируемые гены, ответственные за синтез *de novo* пуриновых нуклеотидов [*Weng et al.*, 1995].

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*.

К моменту начала наших исследований было показано, что сверхэкспрессия устойчивого к ADP фермента PRS из *E. coli* увеличивает накопление инозина штаммом *E. coli*, продуцирующим этот нуклеозид [*Shimaoka et al.*, 2007]. Другими авторами было установлено, что в штамме-продуценте рибофлавина *A. gossypii* избыточная экспрессия PRS дикого типа и мутантных PRS со снятым ингибированием значительно увеличивала выработку этого витамина предположительно из-за избыточного синтеза его предшественника, GTP [*Jiménez et*

al., 2008]. В штамме *B. subtilis,* продуцирующем рибофлавин, одновременная сверхэкспрессия генов *prs* и *ywlF* (кодирует рибозо-5-фосфат-изомеразу, которая катализирует синтез R5P) дикого типа привела к повышению внутриклеточного пула PRPP. Авторы предположили, что это, в свою очередь, привело к усилению транскрипции генов PurR регулона и активировало биосинтез предшественника рибофлавина, GMP. Как следствие – титр рибофлавина в ферментации с подпиткой увеличился для таких штаммов на 25% [*Shi et al*., 2009].

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.

4.2.2.1. *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, вызывающих гиперурикемию и подагру у людей [*Becker et al*., 1995; *Roessler et al*., 1993*; Zoref et al*., 1975] (Рис. 37). Генетические и биохимические исследования показали, что эти мутации приводят к более высокой устойчивости PRS1 к ингибированию ADP и GDP, а также к активации фермента более низкими концентрациями Pi. Поэтому мутантные ферменты проявляли повышенную ферментативную активность, что, в свою очередь, приводило к увеличению биосинтеза PRPP и, следовательно, к ускорению биосинтеза пуриновых нуклеотидов и накоплению мочевой кислоты, которая является конечным продуктом пуринового метаболизма у людей [*Zoref et al*., 1975].

Основываясь на высокой консервативности аминокислотной последовательности PRS среди различных организмов и сходстве третичных, а также пропеллерообразных, состоящих из шести мономеров, четвертичных структур PRS1 и PRS_{Bs}, мы предположили, что мутации в бациллярных PRS, гомологичные мутациям в PRS1, ответственным за активацию белка 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 (ОРС), кодирующую PRS у *B. amyloliquefaciens* K, подбирали, используя опубликованный сиквенс *B. subtilis* 168 (NC_000964.3). Анализ последовательности полученного ПЦР-продукта с помощью секвенирования показал, что он содержал ОРС, гомологичную *prs* из *B. subtilis* (prs_{Bs}) (85% идентичных п. н.). Столь высокий

процент идентичности нуклеотидных последовательностей указывал на то, что клонированный из *B. amyloliquefaciens* ген – *prs* (prs_{Ba}). Нуклеотидная последовательность prs_{Ba} была депонирована в базе данных нуклеотидных последовательностей GenBank под регистрационным номером HQ636460.

Выравнивание аминокислотных последовательностей PRS из *B. subtilis* (PRS_{Bs}), *H. sapiens* (PRS1) и предсказанной последовательности PRS из *B. amyloliquefaciens* (PRS_{Ba}) (Рис. 37) показало, что PRS_{Ba} имеет 96% и 47% идентичных аминокислот с PRS_{Bs} и PRS1, соответственно. Кроме того, аминокислотные остатки D52, N114, L129, D183 и A190 (нумерация аминокислотных остатков здесь и далее по тексту указана, начиная с первой аминокислоты, метионина), идентифицированные в PRS1 как участвующие в аллостерической регуляции [*Becker et al.*, 1995], консервативны в PRS из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*.

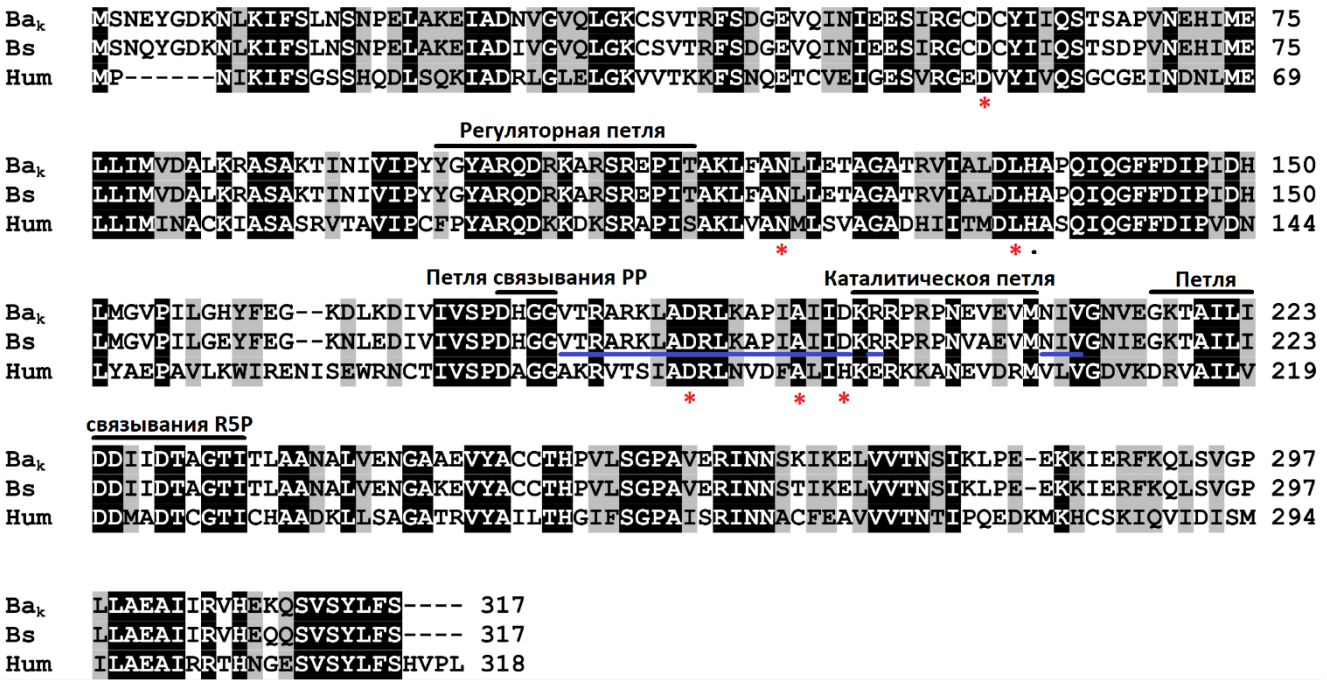


Рис. 37. Сравнение аминокислотной последовательности различных PRS класса I. Последовательности PRS *B. amyloliquefaciens* K IAM 1523 (Ba_k, GenBank: ADU02858.1), *B. subtilis* 168 (Bs, Swiss-Prot: P14193.1), изофермента I PRS человека (Hum, GenBank: CAI42173.1). Отмечены консервативные аминокислотные остатки: идентичные (черный фон, белые буквы), похожие (серый фон) и мутантные остатки в изоферменте I PRS человека, сообщающие устойчивость к ингибированию нуклеотидами (звездочки). Функциональные элементы PRS из *B. subtilis* обозначены линиями над выравниванием (обозначения: PP, дифосфат; R5P, рибозо-5-фосфат). Подчеркнутые синим под последовательностью Bs аминокислотные остатки участвуют в формировании структуры, участвующей в аллостерическом ингибировании. Выравнивание проводили с помощью программы ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw).

Чтобы выявить наиболее перспективные для увеличения накопления пуриновых нуклеозидов мутации в PRPP-синтетазе *B. amyloliquefaciens*, мы выбрали для исследования

мутации D58H, N120S и L135I, которые соответствуют мутациям D52, N114 и L129 у человека. Выбор именно этих аминокислотных замен был сделан на основе сочетания характеристик мутантных белков человека, потенциально перспективных для высокой активности PRS1, а именно, кинетических констант, характеризующих активацию низкими концентрациями фосфата и устойчивость к ингибированию нуклеотидами ADP и GDP, а также высокую степень фенотипического проявления соответствующих мутаций у пациентов, которая могла косвенно характеризовать стабильность мутантного белка [*Becker et al.*, 1995].

С целью изучения свойств мутаций D58H, N120S и L135I у бациллярных PRS и выявления наиболее перспективных из них для улучшения биосинтеза и продукции пуриновых нуклеозидов, была поставлена задача клонировать дикий и мутантный гены *prs* из *B. amyloliquefaciens,* наработать, выделить и очистить их продукты (белок дикого типа, PRS_{BaWT}, и мутантные белки, PRS_{BaD58H}, $PRS_{BaN120S}$ и $PRS_{BaL135I}$), исследовать их биохимические свойства и проверить влияние мутаций на накопление инозина и гуанозина штаммами-продуцентами.

4.2.2.2. Клонирование, гетерологичная экспрессия дикого и мутантных генов *prs* из *B. amyloliquefaciens*, выделение, очистка и изучение биохимических свойств их продуктов

Для экспрессии гена prs_{Ba} и полученных с помощью сайт-направленного мутагенеза его мутантных аллелей prs_{BaD58H}, $prs_{BaN120S}$ и $prs_{BaL135I}$, а также наработки в *E. coli* соответствующих рекомбинантных белков, содержащих на N-конце полигистидиновую последовательность (His-tag), были сконструированы и перенесены в штамм BL21(DE3) плазмиды pET15-PRS, pET15-PRS58, pET15-PRS120 или pET15-PRS135. После индукции экспрессии SDS-PAGE анализ супернатантов клеток, содержащих каждую из экспрессионных плазмид PRS_{Ba} (в отличие от супернатантов, содержащих вектор pET15b(+)) выявил белковую полосу с кажущейся молекулярной массой приблизительно 35 кДа (Рис. 38). Это значение согласуется с молекулярной массой 36,134 кДа, рассчитанной для рекомбинантных белков PRS (ProtParam, http://cn.expasy.org/tools/protparam.html).

Каждый белок был очищен до гомогенности (Рис. 38) с помощью IMAC, как описано в главе «Материалы и методы исследования». Анализ опубликованных трехмерных структур гомологов PRS_{Ba}, PRS_{Bs} и PRS1 [*Eriksen et al.*, 2002; *Li et al.*, 2007, база данных PDB (Protein Data Bank), http://www.pdb.org/] показал, что N-концевые аминокислотные остатки PRS-ферментов экспонированы на поверхности белка и не участвуют в формировании каталитических и аллостерических центров. Поэтому мы предположили, что His-tag на N-конце PRS_{Ba} не изменит каталитических свойств фермента. Действительно, как будет показано ниже, все рекомбинантные белки были очищены в растворимой каталитически активной форме.

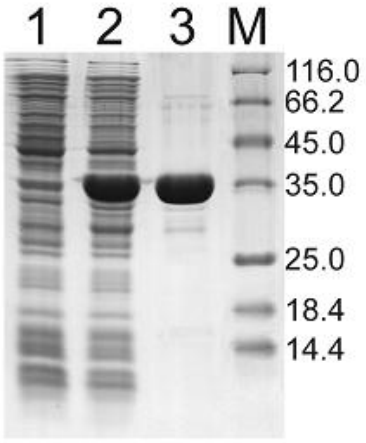


Рис. 38. Экспрессия в *E. coli* и очистка рекомбинантных белков PRS_{Ba}. Образцы белка разделяли с помощью SDS-PAGE и окрашивали красителем Кумасси бриллиантовым синим R250. Дорожка 1, клеточный лизат BL21(DE3), содержащий pET15b(+), индуцированный IPTG (20 мкг белка); дорожка 2, клеточный лизат BL21(DE3), содержащий pET15-PRS, индуцированный IPTG (20 мкг белка); и дорожка 3, очищенный продукт PRS_{BaWT} (6 мкг белка). M, стандарт молекулярной массы (кДа). Изображения для клеточных лизатов BL21(DE3), содержащих pET15-PRS58, pET15-PRS120 или pET15-PRS135, и очищенных рекомбинантных белков PRS_{BaD58H}, $PRS_{BaN120S}$ или $PRS_{BaL135I}$ не приведены, так как они не отличались от клеточного лизата BL21(DE3) pET15-H6-PRS и очищенного белка PRS_{BaWT}, соответственно.

На следующем этапе субъединичные структуры очищенных белков анализировали методом гель-фильтрации. Каждый из белков PRS_{BaWT}, PRS_{BaD58H}, $PRS_{BaN120S}$ и $PRS_{BaL135I}$ элюировался в виде одного симметричного пика в положении, соответствующем молекулярной массе 186 ± 20 кДа, 184 ± 20 кДа, 178 ± 25 кДа и 192 ± 20 кДа, соответственно. Этот результат согласуется с данными о гексамерной четвертичной структуре белков PRS.

Кинетические свойства рекомбинантных PRS из *B. amyloliquefaciens*

Кинетику ферментативных реакций рекомбинантных белков изучали в зависимости от субстратов R5P и ATP (Mg-ATP). При насыщающих концентрациях ATP кинетические данные для всех протестированных ферментов в отношении R5P хорошо описывались гиперболической кривой. При насыщающих концентрациях R5P и различных концентрациях ATP кинетические данные описывались сигмоидальной кривой. Кажущиеся значения V_{max} для белков PRS_{BaWT} и PRS_{BaD58H} были практически идентичными (Таблица 7). Белки $PRS_{BaN120S}$ и $PRS_{BaL135I}$ показали значения V_{max} на 19–32% выше, чем у белка PRS_{BaWT}. Кажущиеся значения K_M для ATP 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 ATP и R5P (Таблица 7). Как и для ферментов PRS класса I из других организмов, оказалось, что для активности PRS из *B. amyloliquefaciens* требуется Pi (Рис. 39, A).

Таблица 7. Кинетические параметры рекомбинантных PRS_{Ba}.

PRS_{Ba}	**ATP**			**R5P**	
	K_M (мкМ)	**n_H**	**V_{max} (Е 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

Примечания: Показаны средние значения ± стандартная ошибка для трех измерений. Е, единица активности фермента (см. «Материалы и методы исследования»).

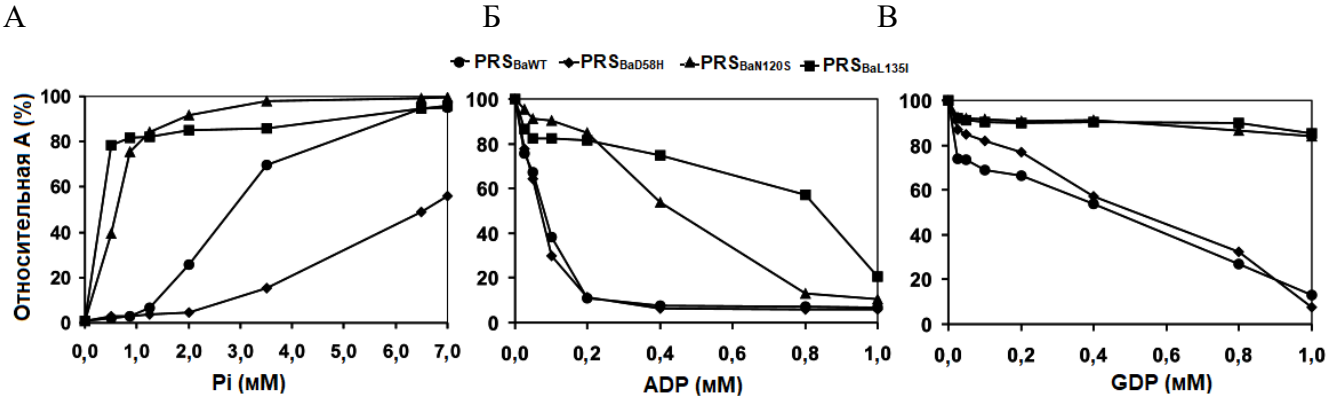


Рис. 39. Влияние Pi (**А**), ADP (**Б**) и GDP (**В**) на активность рекомбинантных PRS_{Ba}. Активность ферментов измеряли в стандартных условиях с модификациями: (**А**) 50 мМ калий-фосфатный буфер при pH 7,5 был заменен на 45 мМ Tris-HCl при pH 7,5 и активатор Pi (KH_2PO_4) добавляли в указанных концентрациях; (**Б**), (**В**) добавляли ингибитор (ADP или GDP, соответственно) в указанных концентрациях. Активность ферментов (Относительная А) выражали относительно удельной активности соответствующих ферментов, измеренной в стандартной реакционной смеси (в присутствии 50 мМ Pi и в отсутствие ADP или GDP) (см. Таблицу 8), которые принимали за 100%. Показаны средние значения трех независимых экспериментов. Стандартные отклонения были менее 12%.

Кривые активации Pi PRS_{BaWT} и трех мутантных ферментов были сигмоидальными со значениями *Ka* 6,7 и 2,7 мМ для PRS_{BaD58H} и PRS_{BaWT}, соответственно. Значения *Ka* 0,6 мМ и менее 0,5 мМ наблюдались для $PRS_{BaN120S}$ и $PRS_{BaL135I}$, соответственно, что указывает на то, что половинная активация $PRS_{BaN120S}$ и $PRS_{BaL135I}$ происходила при значительно более низких концентрациях Pi чем у белка дикого типа (Таблица 8). Оптимальные концентрации Pi для белков PRS_{BaWT}, PRS_{BaD58H}, $PRS_{BaN120S}$ и $PRS_{BaL135I}$ находились в диапазоне от 30 до 50 мМ, а при более высоких концентрациях наблюдался ингибирующий эффект (данные не представлены). Изучение ингибирования ферментов нуклеозиддифосфатами показало, что в соответствии со свойствами PRS I класса PRS_{BaWT} ингибируется ADP (Рис. 39, Б) и GDP (Рис. 39, В). 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 8).

Таким образом, анализ рекомбинантных белков PRS_{Ba} показал, что подобно другим PRPP-синтетазам класса I, PRS_{BaWT} проявлял чувствительность к ADP и GDP и требовал для активности Pi (Рис. 39, A). Значения IC_{50} для ADP и GDP у рекомбинантного белка *B. amyloliquefaciens* дикого типа (Таблица 8) указывали на то, что этот фермент в 2 раза более чувствителен к ингибированию ADP, чем PRS из близкородственного *B. subtilis* [*Arnvig et al.*, 1990], а также в 4 и 10 раз, соответственно, более устойчив к ADP и GDP по сравнению с изоферментом I PRS человека [*Becker et al.*, 1995].

Таблица 8. Удельная активность, значения IC_{50} и константы активации 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**	**–**

[a] Показаны средние значения ± стандартная ошибка для трех измерений. A, специфическая активность; E, единица активности фермента (см. «Материалы и методы исследования»).

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 [*Zoref et al.*, 1975], что может повысить накопление инозина и гуанозина, которые являются конечными продуктами метаболизма пуринов у штаммов, продуцирующих пуриновые нуклеозиды. Необходимо также отметить, что ферментацию со штаммами бацилл, продуцирующими нуклеозиды, обычно проводят в условиях лимита по Pi, чтобы активировать превращение IMP/GMP в инозин/гуанозин фосфорилазами (5'-нуклеотидазами), что способствует большему накоплению нуклеозидов [*Teshiba and Furuya*, 1984].

4.2.2.3. Влияние полученных мутаций в PRPP-синтетазе на рост, потребление глюкозы и продукцию пуриновых нуклеозидов у *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*

Чтобы проверить предположение, что мутации в PRS, которые придают устойчивость к аллостерическому ингибированию и одновременно обеспечивают активацию фермента при

более низких концентрациях Pi, могут положительно влиять на характеристики продуцентов нуклеозидов, с помощью описанного в разделе 4.1 метода мы ввели соответствующие мутации 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. 40. Мутации N120S и L135I увеличивали скорость продукции и общее накопление инозина и гуанозина (Рис. 40, B), 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 9).

Кроме того, мутация N120S, и, в большей степени, мутация L135I, вызывали небольшое, но достоверное увеличение накопления биомассы, тогда как скорости потребления глюкозы у NZBA120 и NZBA135 были несколько снижены (Рис. 40, A). 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 9). 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*. Для этого соответствующие мутации были введены в ген *prs* хромосомы модельного штамма-продуцента пуриновых нуклеозидов, KMBS375 (см. Таблицу 3), в результате чего были получены штаммы NZBS120 и NZBS135, соответственно. Накопление биомассы, потребление глюкозы и продукцию нуклеозидов у штаммов NZBS120 и NZBS135 сравнивали с таковыми у KMBS375 с помощью ферментации в пробирках (Рис. 40 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 с родительским штаммом 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 9). 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.

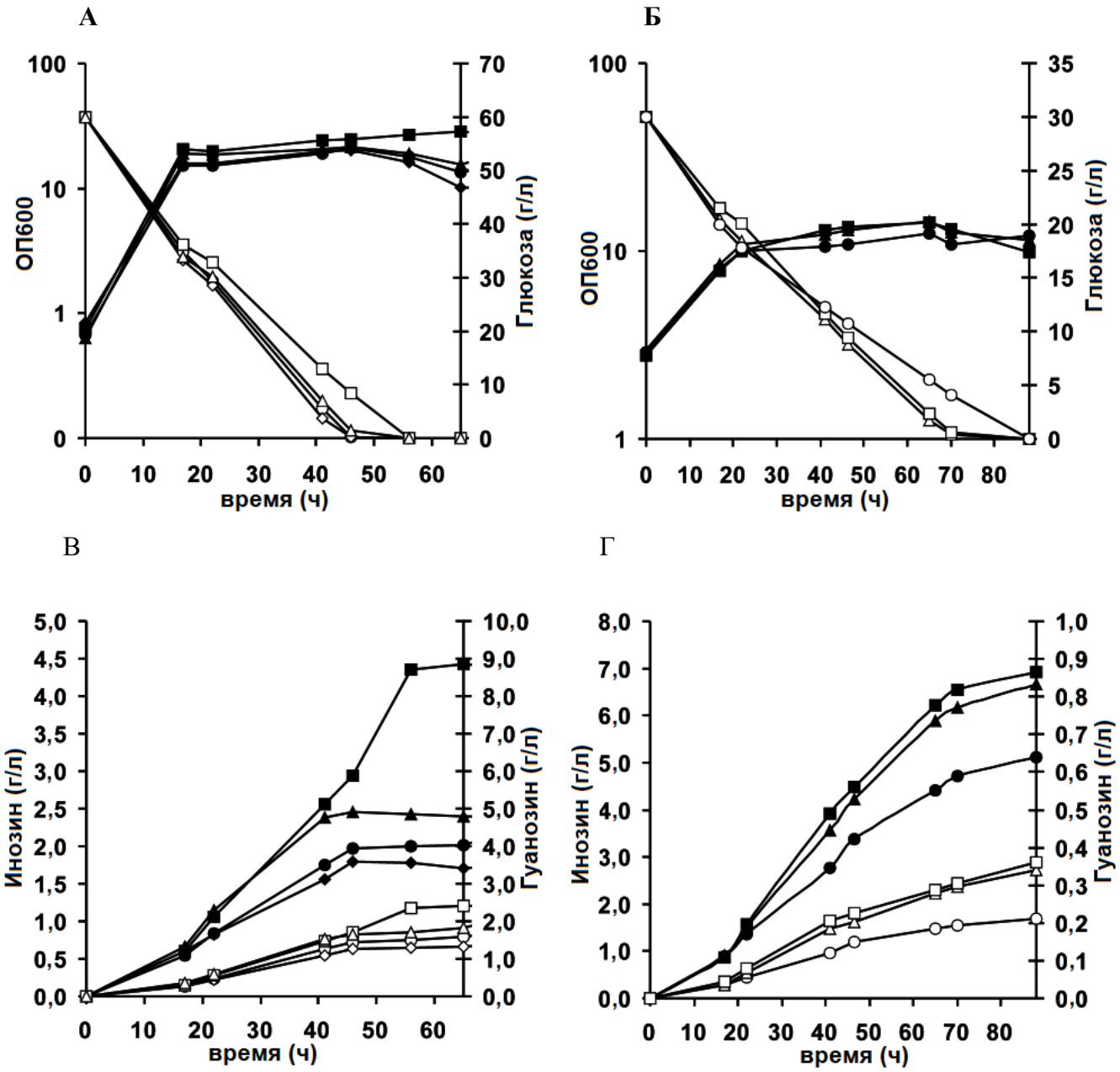


Рис. 40. Влияние различных мутаций PRS на рост, потребление глюкозы и продукцию нуклеозидов у *B. amyloliquefaciens* AJ1991 (**А**, **В**) и *B. subtilis* KMBS375 (**Б**, **Г**). Показаны значения оптической плотности при 600 нм (ОП600), концентрации глюкозы и нуклеозидов (инозина и гуанозина) для штаммов, экспрессирующих $PRS_{Ba/BsWT}$ (кружки), $PRS_{Ba/BsD58H}$ (ромбы), $PRS_{Ba/BsN120S}$ (треугольники) и $PRS_{Ba/BsL135I}$ (квадраты). Значения ОП600 и концентрации инозина показаны закрашенными символами. Концентрации глюкозы и гуанозина показаны незакрашенными символами. Значения представляют собой средние значения трех независимых экспериментов. Стандартные отклонения были менее 5% для концентраций нуклеозидов и глюкозы и менее 8% для значений ОП600.

Таблица 9. Влияние различных мутаций в гене *prs* штаммов-продуцентов нуклеозидов на основе *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* на параметры ферментации.

Штамм	Выход (%) инозина (г) на		Выход (%) гуанозина(г) на		Выход (%) биомассы (г) на глюкозу (г)	Продуктивность (г/л/ч)	
	глюкозу (г)	биомассу (г)	глюкозу (г)	биомассу (г)		инозин	гуанозин
B. amyloliquefaciens							
AJ1991	3,4	31	2,7	25	11,0	0,043	0,031
NZBA58	3,0	29	2,2	21	10,3	0,039	0,027
NZBA120	4,1	37	3,1	27	11,1	0,053	0,036
NZBA135	7,4	50	4,0	27	14,8	0,078	0,042
B. subtilis							
KMBS375	17,0	133	0,70	5,5	12,8	0,058	0,0024
NZBS120	22,2	149	1,13	7,6	14,9	0,076	0,0039
NZBS135	23,1	158	1,20	8,2	14,6	0,079	0,0041

Примечания: Показаны средние значения трех независимых экспериментов. Стандартные отклонения составляли менее 8%.

Как было сказано ранее, по сравнению с родительскими штаммами мутанты N120S и L135I накапливали больше биомассы. Можно предположить, что этот эффект связан с более высокой доступностью PRPP для биосинтеза пиримидиновых и пиридиновых нуклеотидов, а также аминокислот гистидина и триптофана. Более того, у мутантов N120S и L135I на основе промышленных продуцентов был снижен выброс CO_2 (данные не приводятся). В штаммах-продуцентах нуклеозидов, которые обладают устойчивыми к ингибированию нуклеотидами PRS и усиленным биосинтезом пуриновых нуклеотидов, может происходить интенсивный отток R5P, что, в свою очередь, приводит к интенсивному потоку углерода через NADPH-генерирующие реакции окислительного пентозофосфатного пути. Известно, что повышение NADPH угнетает цикл трикарбоновых кислот [*Lim et al.*, 2002], что способствует уменьшению образования CO_2 и более эффективному использованию глюкозы для производства нуклеозидов.

Выводы из раздела 4.2.2.

Для нарушения негативной регуляции биосинтеза PRPP, кодирующий PRPP-синтетазу у *B. amyloliquefaciens* ген *prs* дикого типа был клонирован и получены его мутантные варианты. Дикий и мутантные гены *prs* были экспрессированы в *E. coli*, их продукты наработаны в виде гетерологичных белков, очищены и впервые биохимически охарактеризованы. Показано, что мутации N120S и L135I придают ферменту PRS устойчивость к ретроингибированию ADP и GDP, а также усиливают активацию неорганическим фосфатом. Введение соответствующих

замен в ген *prs* на хромосоме штаммов-продуцентов инозина и гуанозина приводит к заметному увеличению продукции нуклеозидов у *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*. Таким образом, найдены мутации, которые могут быть использованы для улучшения промышленных штаммов *Bacillus*, продуцирующих нуклеозиды, а возможно и другие метаболические производные PRPP.

4.2.3. Усиление конверсии пуриновых нуклеотидов в нуклеозиды

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

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

4.2.3.1.1. *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 HAD, которое включает ферменты, использующие аспартат в активном центре для нуклеофильного катализа реакций переноса углеродной или фосфорильной группы на разнообразный спектр субстратов [*Burroughs et al.*, 2006]. Как было изложено в разделе «Обзор литературы», несколько членов суперсемейства HAD из *E. coli* были идентифицированы и охарактеризованы как многофункциональные ферменты, обладающие очень широкими и перекрывающимися спектрами субстратов. Для большинства из них физиологическая функция в клетке не известна. Один из таких ферментов, UmpH (NagD), активный в отношении целого ряда фосфорилированных соединений, демонстрирует наиболее высокую специфичность к UMP и GMP, и играет важную роль в регуляции биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов и поддержании их физиологических концентраций в клетке [*Tremblay et al.*, 2006; *Reaves et al.*, 2013].

Известно, что продукты ортологичных генов могут обладать сходной функцией в соответствующих организмах. Ортологи – это гены разных видов, которые произошли от общего предкового гена путем видообразования, тогда как паралоги – это гены, появившиеся в результате дупликации внутри генома [*Tatusov et al.*, 1997]. На основе этих эволюционных

отношений предполагается, что ортологи имеют эквивалентные функции в разных организмах, в то время как паралоги считаются источником функциональных изменений. Одним из часто используемых простых методов поиска ортологов является двунаправленный поиск гомологов в двух геномах для выявления взаимных лучших совпадений (reciprocal best hits, RBH) [*Tatusov et al.*, 1997]. Мы применили данный подход, чтобы идентифицировать гены, кодирующие 5'-нуклеотидазы *B. subtilis*. С высокой степенью достоверности ($E=9x10^{-43}$) ортологичным геном для *umpH* из *E. coli* оказался ген *yutF*. Аминокислотные последовательности YutF из *B. subtilis* и UmpH из *E. coli* имели 31% идентичных и 54% сходных а. о. (Рис. 41).

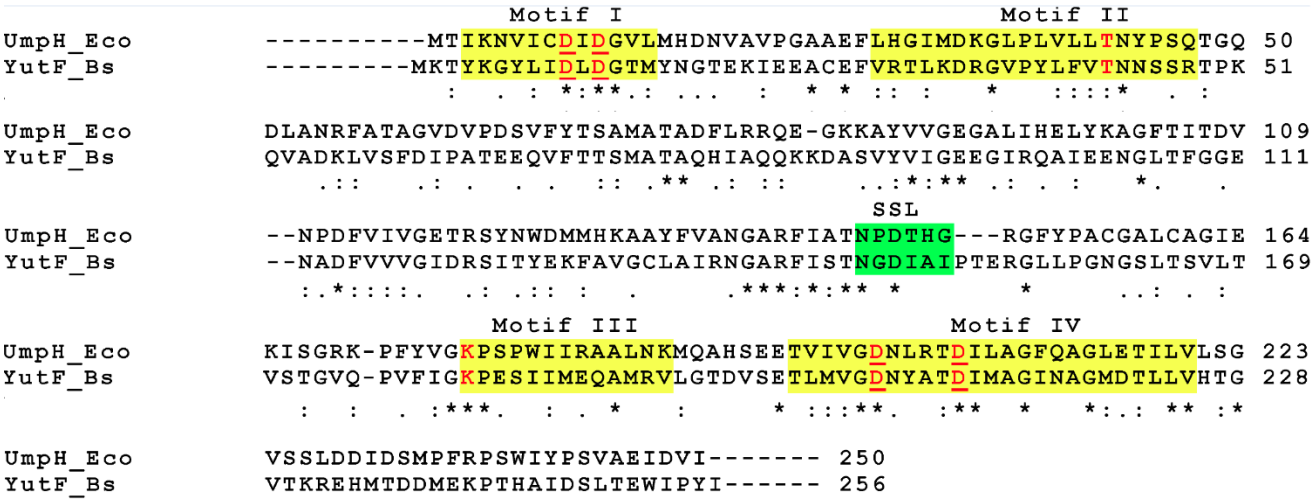
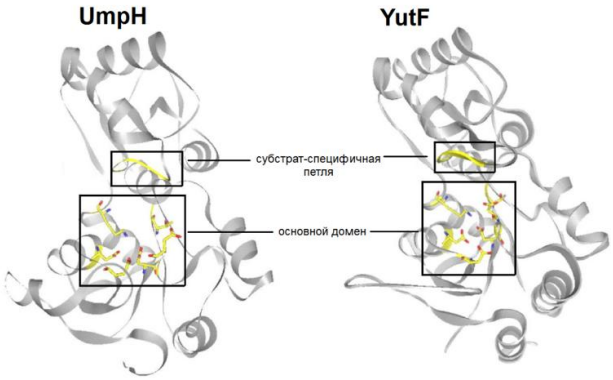


Рис. 41. Сравнение аминокислотной последовательностей *B. subtilis* YutF и *E. coli* UmpH. Консервативные остатки, участвующие в катализе, показаны красным, остатки, необходимые для координации иона Mg в активном центре, подчеркнуты. Приблизительные области четырех консервативных мотивов (Motif I-IV) подсвечены желтым цветом. Консервативные остатки кэп-домена С2, которые могут действовать как субстрат-специфичная петля (SSL), заштрихованы зеленым цветом. Указаны сходные («.» и «:») и идентичные («*») аминокислотные остатки. YutF_Bs, предполагаемая гидролаза из *B. subtilis* (GenBank NP_391109.1); UmpH_Eco, фосфатаза из *E. coli* (NP_415201.1). Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы CLUSTALW [*Larkin et al.*, 2007].

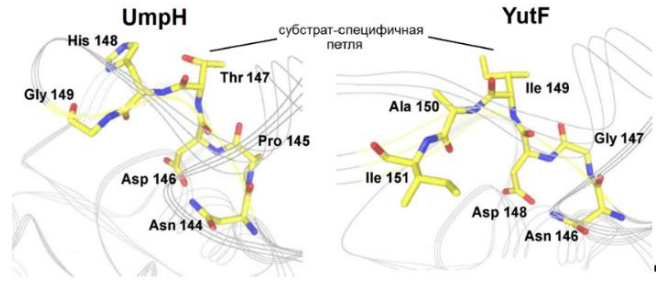
ОРС *yutF* состоит из 256 аминокислотных остатков и имеет предсказанную молекулярную массу мономера 28 кДа. Анализ последовательности белка с использованием программного обеспечения для прогнозирования сигнальных пептидов (Signal P 4.1) и трансмембранных доменов (SOSUI 1.11 и TMHMM 2.0) указывал на внутриклеточную локализацию YutF. Белки UmpH и YutF являются членами суперсемейства HAD, его большого подсемейства IIA (http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR006357). Все члены этого подсемейства содержат высококонсервативный основной (коровый) домен α/β и вариабельный кэп-домен, который освобождает активный сайт для катализа и придает ферменту субстратную специфичность [*Burroughs et al.*, 2006]. Активный сайт основного домена образован четырьмя

петлями, соответствующими мотивам последовательности I-IV (Рис. 41). Кэп-домен C2 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) [*Tremblay et al.*, 2006]. Ферментативная активность и физиологическая роль большинства представителей подсемейства IIA до сих пор не установлены. На момент исследований на основании наличия консервативных доменов YutF был аннотирован в базе данных NCBI Protein (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) как не охарактеризованная гидролаза или предполагаемая *p*-нитрофенилфосфатаза.

А.



Б.



В.

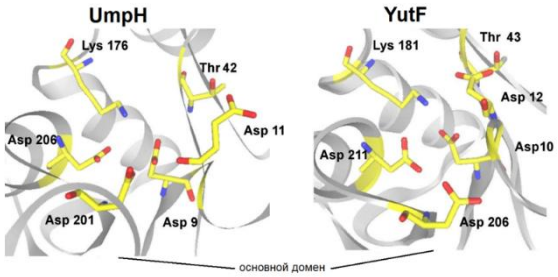


Рис. 42. **А.** Ленточные диаграммы 3D-структур белков UmpH (PDB id: 2c4n) и YutF (PDB id: 3pdw). Основной домен и субстрат-специфичная петля отмечены желтым, их расположение в белке отмечены рамками. **Б.** Увеличенное изображение субстрат-специфичных петель. **В**. Увеличенное изображение основных консервативных доменов. Отмечены идентичные а. о., задействованные в катализе. Диаграмма построена с использованием программы *3D-Mol* Viewer (компонент программы Vector NTI Advance 10 software).

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*-нитрофенил фосфата в клетках *B. subtilis* (Таблица 10).

Таблица 10. Зависимость *p*-нитрофенил фосфатазной активности клеток *B. subtilis* от уровня экспрессии гена *yutF*.

Штамм	***p*-нитрофенилфосфатазная активность, нмоль мин$^{-1}$ мг$^{-1}$**
B. subtilis 168	24,5 ± 2,5
BsΔyutF	<1
BsΔyutF (pMWAL1-Prep-yutF)	542,2 ± 58,0

Примечания: Показаны средние значения трёх независимых экспериментов ± стандартное отклонение

Для исследования биохимических характеристик белка YutF он был наработан в *E. coli* виде рекомбинантного белка Ht-YutF, содержащего полигистидиновую последовательность на N-конце, наработан и очищен до гомогенности с помощью IMAC.

Молекулярный вес нативного белка YutF, 65 ± 10 кДа, определенный с помощью гель-фильтрации, указывал на его димерную организацию. Этот вывод подтверждался и анализом белка с помощью программы PDBePISA, который показал, что YutF в растворенной форме существует в виде димера, стабилизированного 13 водородными связями и 10 солевыми мостиками.

Предварительный скрининг по отношению к неприродным субстратам показал, что в отличие от *p*NPP, бис(п-нитрофенил)фосфат (bis-*p*NPP) и п-нитрофенилфосфорилхолин (*p*NPPC) не являются для Ht-YutF подходящими субстратами, что свидетельствует об отсутствии у фермента фосфодиэстеразной активности.

Определение оптимальных условий реакции рекомбинантного белка по отношению к хромогенному субстрату *p*NPP (*p*-нитрофенил фосфатазная активность) и по отношению к природным фосфорилированным субстратам (5'-нуклеотидазная активность) выявило зависимость от ионов Mg^{2+} и оптимум pH (для *p*-нитрофенил фосфатазной 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 11) и выявлены кинетические параметры фермента в реакции с наиболее предпочтительными субстратами (Таблица 12). Рекомбинантный белок продемонстрировал относительно высокую

фосфогидролазную активность по отношению к R5P, 5'-XMP и PRPP и обладал умеренной активностью по отношению к различным нуклеотидам, гидролизуя преимущественно 5'-нуклеозидмонофосфаты (Таблица 11).

Таблица 11. Активность рекомбинантного Ht-YutF по отношению к *p*NPP, а также к различным природным субстратам.

Субстрат	**Активность, мкмоль мин$^{-1}$ мг$^{-1}$**	**Субстрат**	**Активность, мкмоль мин$^{-1}$ мг$^{-1}$**
*p*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	–	–

Примечания: Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартные отклонения.

Таблица 12. Кинетические параметры Ht-YutF по отношению к наиболее предпочтительным субстратам.

Субстрат	**K_M (мМ)**	**V_{max}** (E mg^{-1})	**k_{cat} (с$^{-1}$)**	**k_{cat}/K_M (с$^{-1}$ М$^{-1}$)**
*p*NPP	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

Примечания: Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартные отклонения. Единицы E: 1 мкмоль P_i, высвобождаемого в минуту при 30 ºC

Специфическая активность в отношении 6-оксопуринсодержащих рибо- и дезоксирибонуклеозидмонофосфатов (5'-XMP, 5'-IMP, 5'-GMP, dGMP и dIMP) была выше, чем в отношении 6-аминопуринсодержащих AMP и dAMP, а также пиримидина. Мы не обнаружили заметной активности фермента в отношении рибонуклеозид-3'-монофосфатов, G6P или UDP-глюкозы. Кроме того, в отличие от ортолога UmpH, который гидролизовал

рибонуклеозидфосфаты, но не дезоксирибонуклеозидфосфаты, рекомбинантный белок YutF был активен в отношении и тех, и других нуклеозидфосфатов. Хотя Ht-YutF демонстрировал довольно низкую субстратную специфичность и каталитическую эффективность для всех тестируемых физиологических субстратов, значения K_M попадали в диапазон значений K_M для других охарактеризованных нуклеотидаз, представленных в базе данных BRENDA (0,01–56 мМ), а каталитическая эффективность соответствовала таковым для 5'-нуклеотидазы UmpH и другого представителя HADSF, подсемейства IIA из *B. subtilis*, фосфатазы AraL. Максимальная скорость реакции наблюдалась для хромогенного субстрата *p*NPP, но сродство Ht-YutF к *p*NPP 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 12). 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 восстановление соответствующих пулов путем дефосфорилирования.

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

In silico анализ нуклеотидной последовательности *yutF* и прилегающих к гену областей хромосомы *B. subtilis* 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. 43). Кроме того, с помощью программы ARNold Finding Terminators были обнаружены две последовательности предполагаемых Rho-независимых терминаторов транскрипции, первая на 5'-конце кодирующей области *yutF* (tgaatttgtcagaacgctgaaagatcgcggcgttccttatctttttcgt, ΔG=-11,5 ккал/моль), и вторая — ниже стоп-кодона *yutF* (acatttgaaaaaagggcgccctaaaagggtgcccttattctcalgtatgccGc, ΔG=-13,9 ккал/моль). Эти данные согласуются с данными анализа транскриптома для этой области хромосомы у *B. subtilis* [*Nicolas et al.*, 2012] и указывают на наличие транскрипционной единицы, включающей ОРС *yutD*, *yutE* и *yutF*, а также на возможную регуляцию экспрессии *yutF* посредством преждевременной терминации транскрипции.

Делеция предположительного промотора (ΔP) или делеция в структурной части гена *yutF* (Δ*yutF*) в хромосоме *B. subtilis* 168 существенно снижала фосфогидролазную активность по отношению к *p*NPP в неочищенных клеточных экстрактах штаммов BsΔP и BsΔyutF,

соответственно, по сравнению с штаммом *B. subtilis* 168, что подтверждает предположение об определяющей роли предположительного промотора P в экспрессии гена *yutF* (Рис. 43).

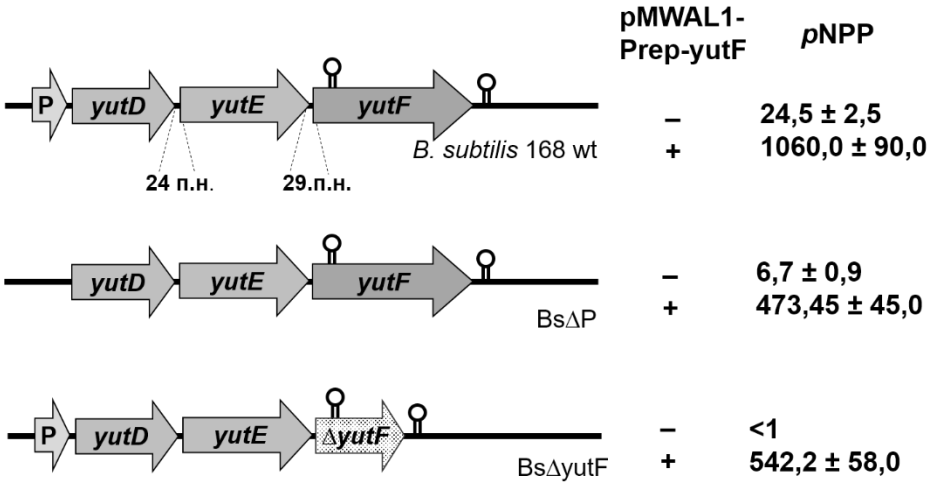


Рис. 43. Схематическое изображение области *yutDEF* хромосомы у штаммов *B. subtilis* 168, BsΔP и BsΔyutF. Указаны предположительный промотор (P) и Rho-независимые транскрипционные терминаторы. Справа указана активность в отношении *p*-нитрофенил фосфата (*p*NPP, нмоль мин$^{-1}$ мг$^{-1}$) в грубых клеточных экстрактах соответствующих бесплазмидных штаммов (-) и штаммов с плазмидой pMWAL1-Prep-yutF (+). Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартные отклонения.

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. 44). Уровень β-галактозидазидазной активности в полученных штаммах позволял оценивать уровень экспрессии гена *yutF*.

Отсутствие в транскрипционных слияниях области, содержащей предполагаемый промотор P, приводило в штаммах BsB1, BsB2 и BsB3 к значительному снижению β-галактозидазидазной 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*-нитрофенил фосфатазы в BsΔP (Рис. 43). 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. 44). 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*.

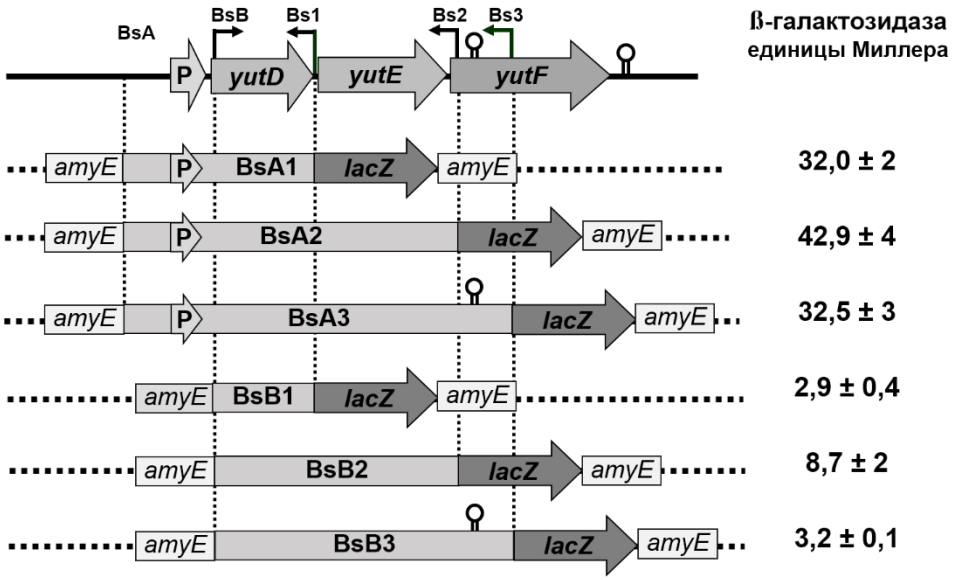


Рис. 44. Схематическое изображение интегрированных в *amyE* локус хромосомы *B. subtilis* 168 транскрипционных слияний различных фрагментов 5' области гена *yutF* с беспромоторным геном *lacZ*. Справа указана активность ß-галактозидазы (единицы Миллера). Даны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартные отклонения.

Далее экспрессию *yutF* исследовали в штаммах BsMTNyutF, BsΔPMTNyutF и BsMTNΔyutF, 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 Pspac (Рис. 45). Штамм BsΔPMTNyutF 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 BsMTNΔyutF содержал делецию в рамке в структурной части гена *yutF*, нарушавшую функцию гена. Значения β-галактозидазидазной и *p*-нитрофенил фосфатазной активности в этих штаммах характеризовали уровень экспрессии гена *yutF* и уровень продукции белка YutF, соответственно. У штамма BsMTNyutF был обнаружен неожиданный ответ на добавление IPTG: значительное усиление не только активности *p*-нитрофенил фосфатазы, но и активности β-галактозидазы (Рис. 45). 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*.

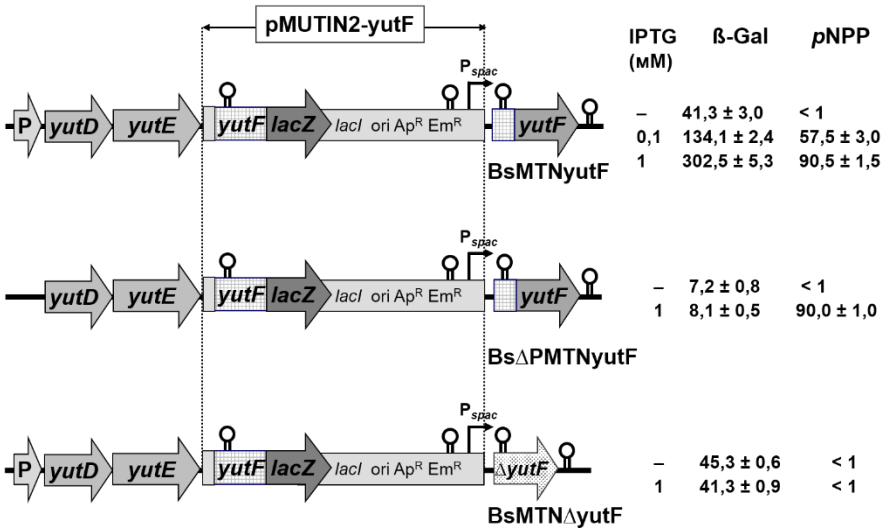


Рис. 45. Схематическое изображение области *yutDEF* хромосомы в штаммах BsMTNyutF, BsΔPMTNyutF и BsMTNΔyutF. Справа приведены активности ß-галактозидазы (единицы Миллера) и *p*-нитрофенил фосфатазы (нмоль мин$^{-1}$ мг$^{-1}$) в грубых клеточных экстрактах указанных штаммов. Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартные отклонения.

Дополнительным доказательством положительной авторегуляции экспрессии *yutF* послужили результаты измерения *p*-нитрофенил фосфатазной активности в штаммах *B. subtilis* 168, BsΔP и BsΔyutF, содержащих плазмиду pMWAL1-Prep-yutF, которая обеспечивала сильную конститутивную экспрессию гена *yutF* (Рис. 43). 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*-нитрофенил фосфатазы при экспрессии *yutF* только с хромосомы (штамм *B. subtilis* 168) составлял 24,5 нмоль мин$^{-1}$ мг$^{-1}$. Следовательно, уровень *p*-нитрофенил фосфатазной 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*-нитрофенил фосфатазная 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 HAD имеют очень похожий активный центр и катализируют те же реакции, что двухкомпонентные системы передачи сигнала [*Ridder and Dijkstra*, 1999; *Immormino et. al*., 2015], позволяющие организмам распознавать и реагировать на изменения в различных условиях окружающей среды [*Stock et al*., 2000], а также недавними исследованиями, которые показали способность некоторых членов суперсемейства HAD претерпевать конформационные изменения в процессе катализа [*Biswas et al*., 2009; *Srinivasan et al*., 2014].

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 [*Rittmann et al*., 2005]. Однако мы показали, что 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 отсутствие продукции YutF (условия без добавления IPTG) (Рис. 46). 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.

Гены, гомологичные *yutF*, встречаются у различных бацилл, 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 показали 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.

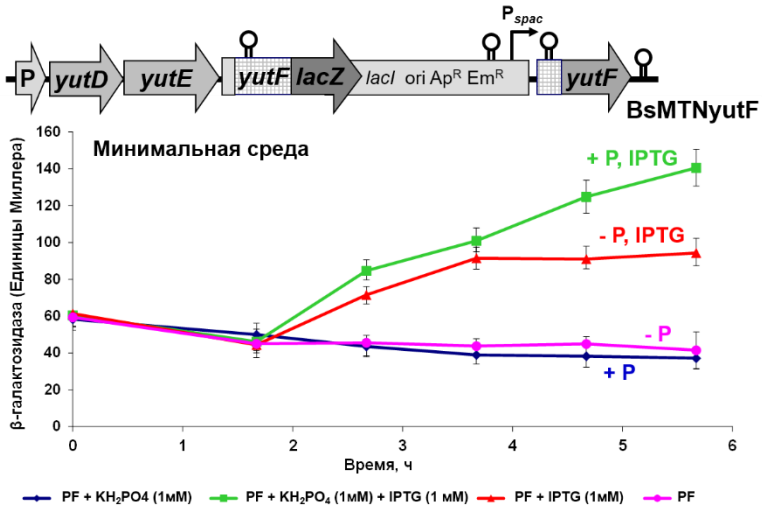


Рис. 46. Влияние доступности неорганического фосфата и присутствия IPTG на активность β-галактозидазы в штамме BsMTNyutF при культивировании в минимальной среде без фосфатов (МС), кривая розового цвета; в присутствии 1 мМ KH_2PO_4, кривая синего цвета; в присутствии 1 мМ IPTG, кривая красного цвета; в присутствии 1 мМ KH_2PO_4 и 1 мМ IPTG, кривая зеленого цвета. Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартные отклонения.

4.2.3.1.2. Прямая фенотипическая селекция генов 5'-нуклеотидаз на устойчивость 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 специальном реципиентном штамме с помощью селекции по фенотипу.

С этой целью был использован сконструированный штамм-реципиент *E. coli* GS72 (TG1 Δ*deoD gsk-3*), который содержал делецию в гене *deoD*, кодирующем пуриннуклеозидфосфорилазу, и мутацию устойчивости к ингибированию конечным продуктом

в гене гуанозинкиназы (*gsk-3*) (Рис. 47). В результате этих мутаций в штамме GS72 была нарушена деградация пуриновых нуклеозидов и одновременно усилена их конверсия в нуклеотиды. При добавлении в среду культивирования пуриновых нуклеозидов (аденозина, инозина или гуанозина) в клетках штамма GS72 накапливался высокий пул адениловых и гуаниловых нуклеотидов, который подавлял активность PRPP-синтетазы, вызывая, таким образом, голодание по синтезируемым из PRPP метаболитам и остановку роста клеток.

Мы предположили, что амплификация генов, обеспечивающих дефосфорилирование пуриновых нуклеотидов в клетках GS72, позволит снизить их внутриклеточный пул, снять ингибирование PRPP-синтетазы, восстановить синтез PRPP и, таким образом, обеспечить рост клеток GS72 в присутствии экзогенно добавленных пуриновых нуклеозидов. Поэтому данную систему мы решили использовать для поиска генов, кодирующих ферменты с 5'-нуклеотидазной активностью у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. Важно отметить, что амплификация генов экскреции пуриновых нуклеозидов может также снимать ингибирование роста GS72 в присутствии этих нуклеозидов в среде культивирования. Реализация этого подхода для поиска генов эффлюкса пуриновых нуклеозидов будет описана в разделе 4.2.4.

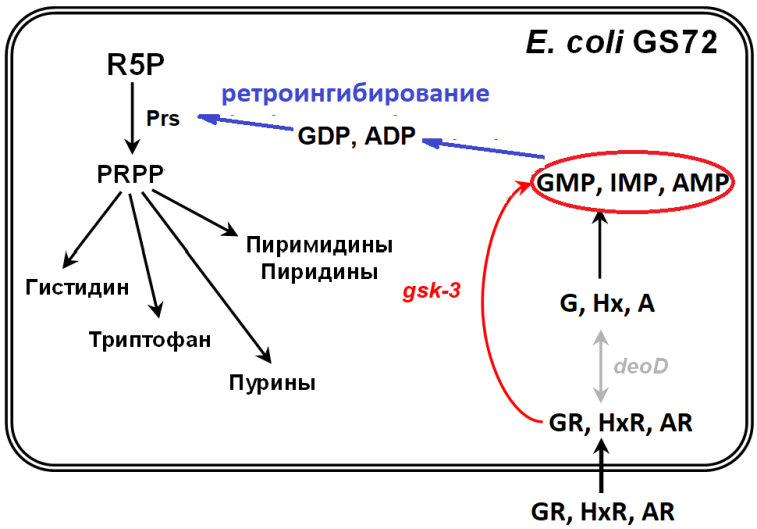


Рис. 47. Схематическое изображение механизма подавления роста штамма GS72 экзогенно добавленными пуриновыми нуклеозидами.

Для поиска генов фосфатаз пуриновых нуклеотидов, мы использовали метод «shotgun», геномные библиотеки получали на основе малокопийного вектора pMW118. Чтобы исключить селекцию генов пуриннуклеозидфосфорилаз в процессе поиска, библиотеки получали на хромосомах штаммов *B. subtilis* 168 и *B. amyloliquefaciens* IAM1523 с делециями соответствующих генов, *deoD* и *pupG*. 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. Идентификации генов, ответственных в плазмидах pMW118-34 и pMW118-26 за фенотип устойчивости к нуклеозидам, изучению их белковых продуктов и возможной физиологической роли в клетке будут посвящены последующие разделы настоящей работы.

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) [*Aravind and Koonin*, 1998].

Анализ предсказанной аминокислотной последовательности *in silico* с помощью программ Signal P 4.1, SOSUI 1.11 и TMHMM 2.0 указывал на внутриклеточную локализацию белка.

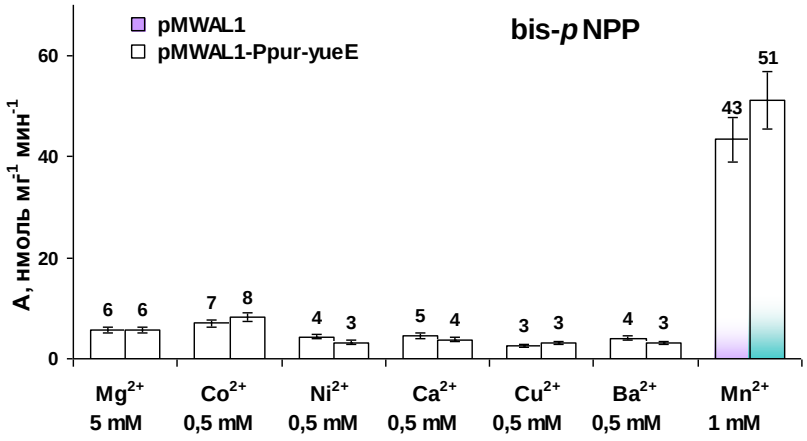
С целью поиска возможных субстратов для YueE провели энзиматический скрининг. Для этого в грубых клеточных экстрактах штаммов *B. subtilis*, содержащих пустой вектор или плазмиду для экспрессии $yueE_{Bs}$, в присутствии различных ионов двухвалентных металлов (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Ca^{2+}, Ni^{2+}, Ba^{2+}, Cu^{2+}) определяли фосфатазную и фосфодиэстеразную (PDE) активности в отношении хромогенных субстратов *p*NPP, bis-*p*NPP или *p*NPPC при pH от 5 до 9. Поскольку повышенная активность при экспрессии $yueE_{Bs}$ обнаруживалась только в присутствии bis-*p*NPP в буфере с ионами Mn^{2+}, был сделан предварительный вывод о фосфодиэстеразной активности фермента и его активации ионами Mn^{2+} (Рис 48, А).

Для получения более точных сведений об активности, а также о биохимических характеристиках рекомбинантного белка YueE, ген $yueE_{Bs}$ клонировали в составе экспрессионного вектора для трансляции $YueE_{Bs}$ в виде белка, содержащего полигистидиновую последовательность на N-конце (Ht-YueE), экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3), выделили и очистили белок с помощью IMAC.

Молекулярный вес белка Ht-YueE составил 43 ± 6 кДа, что свидетельствует о том, что в активной форме он представляет собой димер (расчетное значение молекулярной массы мономера YueE = 20,0 кДа) (Рис. 49).

Очищенный рекомбинантный белок показал наличие активности в отношении как хромогенного субстрата bis-*p*NPP, так и природного циклического нуклеотида 2',3'-cAMP (Рис 48, Б), что подтвердило наличие у белка фосфодиэстеразной активности.

А.



Б.

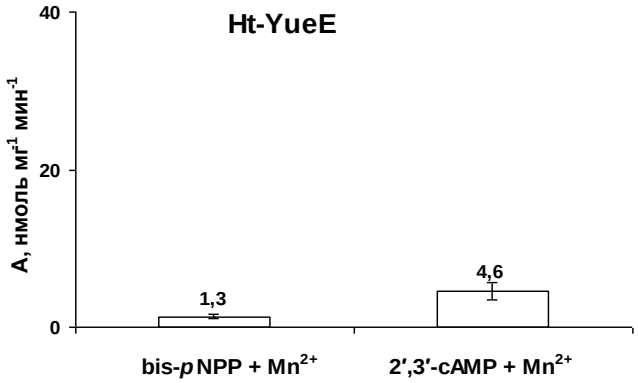


Рис. 48. Фосфодиэстеразная активность (**А**) в грубых клеточных экстрактах штаммов *B. subtilis* 168, содержащих плазмиды pMWAL1 и pMWAL1-Ppur-yueE и (**Б**) очищенного рекомбинантного белка Ht-YueE по отношению к bis-*p*NPP и 2',3'-cAMP.

Количественное определение возможных продуктов реакции (3'-AMP и 2'-AMP) показало, что фермент образует при гидролизе исключительно 3'-AMP, гидролизуя 2'-связь (Рис. 50). Кинетические константы рекомбинантного белка YueE в отношении 2',3'-cAMP представлены в Таблице 13.

Таким образом, продукт гена *B. subtilis yueE* был впервые охарактеризован как белок, обладающий фосфодиэстеразной активностью в отношении 2',3'-cAMP. Поиск гомологичных YueE белков с помощью программы BLASTp показал, что белок является консервативным и 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'-cAMP, играют важную регуляторную роль в клетках [*Jackson*, 2017; *Gomelsky*, 2011]. Можно предположить, что ген

yueE, продукт которого участвует в гидролизе циклических нуклеотидов, может быть вовлечен в регуляторные процессы клетки. 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.

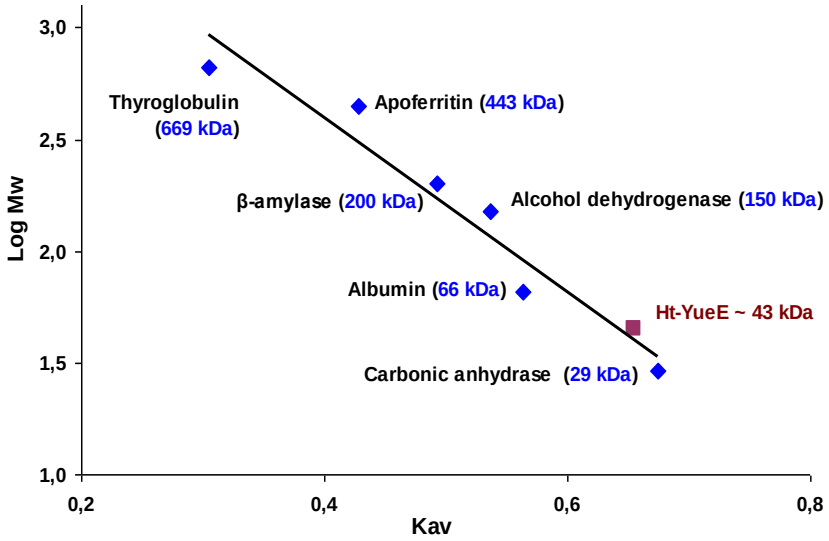


Рис. 49. Определение молекулярного веса белка Ht-YitU$_{Bs}$ с помощью гель-фильтрации. Для построения калибровочной кривой использовали молекулярные массы известных белков (Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 29,000-700,000 Da, Sigma-Aldrich, St, Louis, USA).

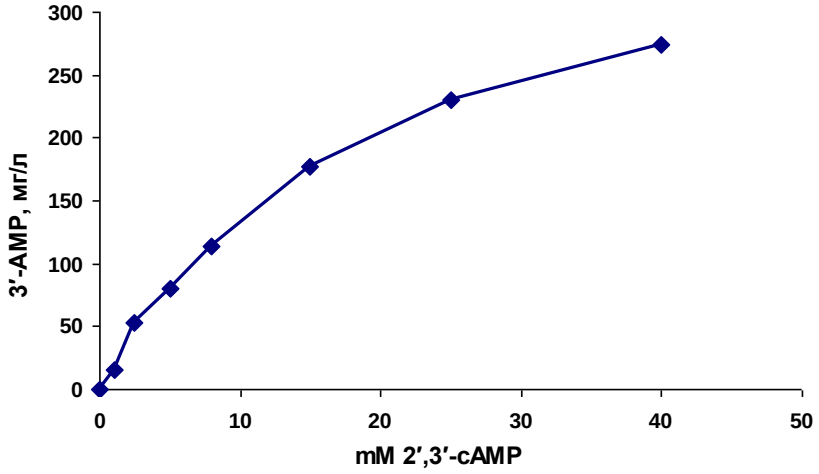


Рис. 50. Кинетика ферментативной реакции Ht-YueE.

Таблица 13. Кинетические параметры Ht-YueE

Субстрат	**Специфическая активность, А (Е 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

Примечания: Е – единица активности фермента. Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартные отклонения.

Дальнейший поиск генов 5'-нуклеотидаз, специфичных к пуриновым нуклеотидам, продолжили изучением второй плазмиды (pMW118-26), отобранной в штамме GS72 в результате селекции по фенотипу устойчивости к пуриновым нуклеозидам.

Идентификация гена *yitU, in silico* анализ генов *yitU* из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*

Минимизация вставки в составе плазмиды pMW118-26 показала, что за фенотип устойчивости к пуриновым нуклеозидам отвечает ген *B. amyloliquefaciens yitU*, кодирующий предположительную фосфатазу.

In silico анализ открытых рамок считывания *yitU* из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* ($yitU_{Bs}$ и $yitU_{Ba}$, соответственно) обнаружил высокое сходство их нуклеотидных последовательностей (75,2%). 5'-нетранслируемые области генов $yitU_{Bs}$ и $yitU_{Ba}$ не содержали последовательностей, которые бы хорошо соответствовали консенсусным последовательностям известных промоторов SigA. Однако, согласно опубликованным данным [*Nicolas et al.*, 2012], $yitU_{Bs}$ транскрибируется с промотора SigA как часть трицистронного транскрипта, который также включает лежащие за ним гены BSU_11136 и *yizC*, функции которых неизвестны (Рис. 51). Действительно, с помощью программы ARNold Finding Terminators мы не обнаружили последовательностей предполагаемых Rho-независимых терминаторов транскрипции непосредственно за кодирующей областью *yitU*.

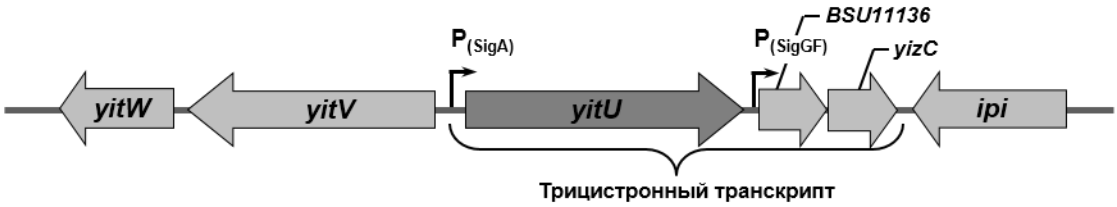


Рис. 51. Схематическое изображение геномной организации *yitU* у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*.

На основании небольшого совпадения с оптимальной консенсусной последовательностью идентифицированного промотора *yitU* из *B. subtilis* можно предположить умеренную экспрессию этого гена, по крайней мере, во время экспоненциального роста. 5'-нетранслируемые области $yitU_{Bs}$ и $yitU_{Ba}$ имели различия в промоторных последовательностях и последовательностях Шайна-Дальгарно (SD), указывающие на различия в уровнях экспрессии этих генов. Последнему не противоречил тот факт, что плазмиды pMWAL1-$yitU_{Bs}$ и pMWAL1-$yitU_{Ba}$, в которых $yitU_{Bs}$ и $yitU_{Ba}$, соответственно, экспрессируются под контролем их собственных регуляторных элементов, придавали клеткам GS72 разные уровни устойчивости к пуриновым нуклеозидам и к аналогу пурина 2,6-диаминопурину (DAP) (Таблица 14). Более того, pMWAL1-P$yitU_{Ba}$-$yitU_{Bs}$, которая содержала фрагмент ДНК, в котором кодирующая

область *yitU*$_{Bs}$ была помещена под контроль 5'-нетранслируемой области *yitU*$_{Ba}$, сообщала более высокий уровень устойчивости к пуринам, чем pMWAL1-yitU$_{Bs}$. Как будет показано далее, сходная разница в уровнях экспрессии *yitU* и активностях YitU для указанных плазмид наблюдалось также и в бациллярных штаммах.

Таблица 14. Влияние сверхэкспрессии *yitU* на устойчивость клеток *E. coli* GS72 к пуриновым нуклеозидам и аналогу пурина DAP.

Штамм	**Минимальные ингибирующие концентрации (МИК, мкг мл$^{-1}$)***		
	GR	HxR	DAP
GS72 (pMWAL1)	<5	<500	<200
GS72 (pMWAL1-yitU$_{Bs}$)	15	500	300
GS72 (pMWAL1-yitU$_{Ba}$)	20	2000	400
GS72 (pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$)	20	2000	400

Примечание: МИК была определена как самая низкая концентрация ингибитора, предотвращающая рост в минимальных чашках с агаром после 40-часовой инкубации. Эксперименты повторяли от трех до пяти раз, показаны репрезентативные результаты.

Рис. 52. Выравнивание аминокислотной последовательности YitU из *B. amyloliquefaciens* (YitU_Ba, GenBank AEB23217.1) и *B. subtilis* (YitU_Bs, GenBank NP_388995.1). Под выравниванием отмечены подобные («.» и «:») и идентичные («*») а. о. Выравнивание последовательностей проводили с помощью CLUSTAL Omega. https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/.

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 HAD-IIB Cof-типа суперсемейства HAD и кластеру ортологичных групп белков

(COG) № 0561 (гидроксиметилпиримидинпирофосфатаза и другие фосфатазы семейства HAD, ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/COG/ COG2014/static/byCOG/COG0561.html). Транслированные белки $YitU_{Bs}$ и $YitU_{Ba}$ имеют 78,9% идентичных и 87,0% сходных аминокислотных остатков (Рис. 52), что предполагает идентичную функцию этих белков в клетках.

Биохимические свойства продукта гена *yitU*

Чтобы охарактеризовать биохимические свойства белка YitU, два варианта *yitU*$_{Bs}$ (для трансляции $YitU_{Bs}$ в его нативной форме и в виде белка Ht-$YitU_{Bs}$, содержащего полигистидиновую последовательность на N-конце) были экспрессированы в штамме *E. coli* BL21(DE3). Измерение фосфатазной активности в отношении *p*NPP в неочищенных клеточных экстрактах штаммов BL21(DE3) (pET15b(+)), BL21(DE3) (pET15-yitU_{Bs}) и BL21(DE3) (pET15-H6-yitU_{Bs}) показало наличие этой активности в штаммах с экспрессией гена *yitU*$_{Bs}$, причем, гистидиновая метка на N-конце не влияла на величину этой активности (данные не приведены). Поэтому дальнейшее исследование проводили с рекомбинантным белком Ht-$YitU_{Bs}$, произведенным штаммом BL21(DE3) (pET15-H6-yitU_{Bs}) и очищенным с помощью IMAC до гомогенности.

Субъединичную структуру Ht-$YitU_{Bs}$ анализировали методом гель-фильтрации. Белок элюировался в виде одного симметричного пика со временем удерживания, примерно соответствующим молекулярной массе 32 ± 5 кДа, что указывает на то, что белок существует в виде мономера (расчетное значение молекулярной массы мономера Ht-YitU = 31,9 кДа).

Скрининг хромогенных субстратов для фосфатазы Ht-$YitU_{Bs}$ показал, что в отличие от белка YueE, активность была обнаружена в отношении *p*NPP, а бис-*p*NPP и *p*NPPC не являются субстратами, что свидетельствует об отсутствии у фермента фосфодиэстеразной активности. Оптимальный pH для гидролиза *p*NPP и GMP в качестве искусственного и физиологического субстратов, соответственно, был определен как 7,0 (в 50 мМ имидазольном буфере). Оказалось, что подобно другим членам суперсемейства HAD, Ht-$YitU_{Bs}$ использует Mg^{2+} (5 мМ) в процессе катализа. Подобранные оптимальные условия использовали для измерения активности 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 15).

Наиболее предпочтительными субстратами оказались FMN, dAMP, GMP, dGMP, CMP, AMP, XMP, IMP и AICAR. Для этих соединений были изучены кинетические параметры фермента (Таблица 16).

Таблица 15. Специфическая активность рекомбинантного Ht-YitU$_{Bs}$ по отношению к различным субстратам.

Субстрат	**Специфическая активность, A (E мг$^{-1}$)**	**Источник**
FMN (0,1 мМ)	24,8 ± 3,6	Данная работа
	17 ± 2	[*Sarge et al*., 2015]
ArPP (0,3 мМ)	1,7 ± 0,4	
dAMP	13,1 ± 1,9	Данная работа
GMP	12,1 ± 1,7	
CMP	10,9 ± 1,5	
AMP	9,7 ± 1,4	
dGMP	9,5 ± 1,6	
XMP	8,4 ± 1,4	
IMP	6,4 ± 0,9	
AICAR	2,8 ± 0,6	
2'-AMP	2,2 ± 0,4	
CDP	1,4 ± 0,4	
UMP	1,3 ± 0,3	
GDP	1,3 ± 0,4	
6-фосфо-глюконат	1,2 ± 0,3	
IDP	0,90 ± 0,19	
Пиридоксаль-5-фосфат	0,78 ± 0,12	
NADP$^+$	0,75 ± 0,11	
Рибозо-5-фосфат	0,54 ± 0,08	
TDP	0,52 ± 0,07	
Маннозо-6-фосфат	0,52 ± 0,07	
3'-AMP	0,37 ± 0,06	
Глюкозо-6-фосфат	0,33 ± 0,05	
ADP	0,32 ± 0,05	
Фруктозо-6-фосфат	0,29 ± 0,04	
ITP	0,21 ± 0,04	
Эритрозо-4-фосфат	0,19 ± 0,03	
CTP	0,16 ± 0,03	
GTP	0,14 ± 0,02	
Фосфорибозилпирофосфат	0,13 ± 0,02	
UDP	0,13 ± 0,02	
ATP	0,12 ± 0,02	
FAD	<0,1	
UTP	<0,1	
Фосфоенолпируват	<0,1	
Глюкозо-1-фосфат	<0,01	
Фосфорноуксусная кислота	<0,01	

Примечания: Концентрации субстратов составляли 3 мМ (если не указано иное). ArPP, 5-амино-6-рибитиламино-2,4-(1H, 3H)-пиримидиндион-5'-фосфат. E – единица активности фермента. Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартная ошибка.

Таблица 16. Кинетические параметры Ht-YitU$_{Bs}$ по отношению к наиболее предпочтительным субстратам.

Субстрат	K_M **(мМ)**	V_{max} **(Е 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	$2{,}46\ 10^3$
CMP	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	$1{,}11\ 10^3$

Примечания: Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартная ошибка. Е – единица активности фермента.
* Данные для ArPP приведены по [*Sarge et al.*, 2015].

Кинетическое поведение фермента при гидролизе тестируемых субстратов, за исключением AICAR, соответствовало кинетике Михаэлиса-Ментен. Для AICAR реакция характеризовалась положительной кооперативностью с коэффициентом Хилла 1,83 ± 0,15.

Было показано, что значения K_M лежат в диапазоне миллимолярных концентраций, что говорит о низкой субстратной специфичности и умеренной каталитической эффективности Ht-YitU$_{Bs}$ по отношению ко всем протестированным субстратам, за исключением FMN. Для него константа Михаэлиса была почти на три порядка ниже, а каталитическая эффективность на два порядка выше, чем в случае других протестированных в данной работе субстратов.

Одновременно с нашими исследованиями биохимических свойств YitU Sarge et al. [2015] обнаружили, что продукты генов *ycsE*, *ywtE* и *yitU* из *B. subtilis* с высокой каталитической эффективностью осуществляют дефосфорилирование промежуточного соединения в пути биосинтеза рибофлавина, ArPP (см. Рис. 14), с образованием пиримидинового предшественника рибофлавина. Авторы также показали относительно высокую специфическую активность белков YcsE, YwtE и YitU в отношении FMN. Хотя *Sarge et al.* [2015] не изучали кинетические параметры YitU по отношению к FMN в качестве субстрата, их данные по специфической активности очищенного рекомбинантного YitU по отношению к этому соединению согласуются со значением, полученным в наших экспериментах (Таблица 15).

Из-за коммерческой недоступности ArPP мы не изучали активность и кинетические характеристики Ht-YitU$_{Bs}$ по отношению к этому соединению, для сравнения использовали данные, полученные Sarge и соавторами [2015]. Мы обнаружили, что, хотя, константы Михаэлиса для ArPP и FMN были примерно одинаковыми, каталитическая константа (*kcat*) и

каталитическая эффективность фермента ($kcat/K_M$) в отношении FMN были значительно выше, чем для ArPP (Таблица 16), что говорит о том, что предпочтительным субстратом для YitU является именно FMN.

Наличие нескольких ферментов (YcsE, YwtE и YitU), активных в отношении ArPP 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. Производными этих флавинов являются окислительно-восстановительные коферменты, которые связываются с белками с образованием флавопротеинов. Флавопротеины участвуют в самых разных метаболических путях, включая транспорт электронов, репарацию ДНК, биосинтез нуклеотидов, синтез кофакторов и гемовых групп, β-окисление жирных кислот и катаболизм аминокислот [*Abbas and Sibirny*, 2011]. Роль флавопротеинов в клеточном окислительно-восстановительном обмене обеспечивается способностью флавинов переносить электроны. Важно отметить, что в отличие от других кофакторов переноса электронов, флавины могут обслуживать процессы как одноэлектронного, так и двухэлектронного переноса [*Edwards*, 2014], что делает их одним из наиболее важных типов кофакторов в клетках. Внутриклеточные концентрации, состав и соотношение свободных флавинов должны строго регулироваться. FMN контролирует биосинтез и транспорт рибофлавина, регулируя соответствующие гены на уровне транскрипции или трансляции через механизм рибопереключателя [*Gelfand et al.*, 1999; *Winkler et al*., 2002a]. Фосфатазы с различной специфичностью к флавинам, 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*) [*Mack et al*., 1998].

Промежуточный продукт пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов (см. Рис. 11, 13), 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 метаболизмы [*Hürlimann et al*., 2011; *Daignan-Fornier and Pinson*, 2012; *Bazurto et al*., 2015; *Ducker and Rabinowitz*, 2015; *Malykh et al*., 2018].

Как отмечалось выше, кинетика гидролиза AICAR демонстрировала сигмоидальное поведение с коэффициентом Хилла 1,83 ± 0,15, что указывает на аллостерическую регуляцию фермента и положительную кооперативность. При этом эксперименты по гель-фильтрации показали, что активная форма фермента представляет собой мономер. Хотя кооперативность традиционно наблюдается у ферментов со множественными сайтами связывания лигандов и/или мультисубъединичными структурами, было описано и несколько мономерных ферментов

с сайтами связывания одиночных лигандов, которые также проявляют кооперативность [*Porter and Miller*, 2012]. В качестве примера можно привести глюкокиназу млекопитающих, которая проявляет особый тип аллостерической регуляции, при котором кооперативность наблюдается за счет скоростей превращения субстрата, связанных исключительно с конформационной реорганизацией, происходящей при связывании этого субстрата [*Storer and Cornish-Bowden*, 1976; *Larion and Miller*, 2012]. 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 [*Daignan-Fornier and Pinson*, 2012]). Следовательно, YitU может гидролизовать AICAR в условиях чрезмерного синтеза этого метаболита. Более того, положительная кооперативность фермента при гидролизе AICAR может позволить клетке адаптироваться к условиям, в которых пул AICAR увеличивается значительно. Наши эксперименты по изучению эффекта сверхэкспрессии *yitU* в штамме с повышенным пулом AICAR, которые будут изложены в разделе 4.2.3.2.2., согласуются с этим предположением.

В целом, внутриклеточные нуклеотидазы / фосфатазы суперсемейства HAD проявляют более низкую каталитическую эффективность, чем связанные с мембраной, закрепленные на клеточной стенке или внеклеточные нуклеотидазы, одной из основных функцией 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».

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

4.2.3.2.1. Положительный эффект сверхэкспрессии *yitU* на продукцию рибофлавина

Сверхэкспрессия *yitU* увеличивает внеклеточное накопление рибофлавина у штамма *B. subtilis* дикого типа

Для изучения физиологической роли продукта гена *yitU* в клетках получили бациллярные штаммы, которые содержали делецию гена (Δ*yitU*) и описанные выше плазмиды pMWAL1-yitU$_{Bs}$, pMWAL1-yitU$_{Ba}$, pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$, обеспечивающие сверэкспрессию генов *yitU* из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens.*

Инактивация *yitU* на хромосоме штамма *B. subtilis* дикого типа практически не влияла на рост клеток и скорость потребления глюкозы при культивировании в минимальной среде

(данные не показаны). Интересно, что экспрессия *yitU* с плазмид pMWAL1-yitU$_{Bs}$, pMWAL1-yitU$_{Ba}$, pMWAL1-PyitUBa-yitU$_{Bs}$ при культивировании клеток штаммов *B. subtilis* BsC^{+} и BsΔyutF придавала культуральной жидкости желто-зеленую окраску (Рис. 53). Интенсивность окраски была наиболее сильной в случае плазмиды pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$. Именно эта плазмида, как было показано выше, обеспечивала самый высокий уровень устойчивости к пуриновым нуклеозидам у GS72 (см. Таблицу 14), а также, как оказалось, сообщала клеткам *B. subtilis* самый высокий уровень 5'-нуклеотидазной активности (Рис. 54), что свидетельствует о том, что она обеспечивает наиболее высокий уровень экспрессии гена *yitU*. Интересно отметить, что накопление окрашенного вещества в культуральной жидкости штаммов, изогенных BsC^{+}, но содержащих делецию гена 5'-нуклеотидазы *yutF*, было несколько выше. Возможные причины этого будут рассмотрены в этом разделе ниже.

Как было показано выше, FMN является предпочтительным субстратом для YitU, поэтому мы предположили, что окраску среде придает накапливающийся в культуральной жидкости продукт дефосфорилирования FMN, рибофлавин. Действительно, культуральная жидкость с окрашенным продуктом флуоресцировала в УФ-свете (Рис. 53 Б, Г), как это характерно для растворов рибофлавина.

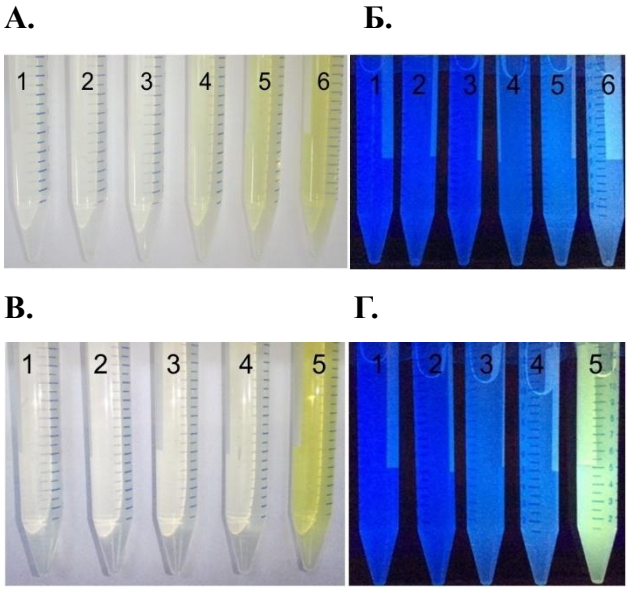


Рис. 53. Влияние сверхэкспрессии гена *yitU* в штаммах *B. subtilis* BsC^{+} и BsΔyutF на появление окрашивания культуральной жидкости в процессе культивирования. **А, Б** – супернатанты культуральной жидкости штамма BsC^{+} и его производных: 1. BsC^{+}, 2. BsC^{+}ΔU, 3. BsC^{+} (pMWAL1), 4. BsC^{+} (pMWAL1-yitU$_{Bs}$), 5. BsC^{+} (pMWAL1-yitU$_{Ba}$), 6. BsC^{+} (pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$). **В, Г** – супернатанты культуральной жидкости штамма BsΔyutF и его производных: 1. BsΔyutF, 2. BsΔyutF (pMWAL1), 3. BsΔyutF (pMWAL1-yitU$_{Bs}$), 4. BsΔyutF (pMWAL1-yitU$_{Ba}$), 5. BsΔyutF (pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$). **Б, Г** – изображение получено в УФ лучах.

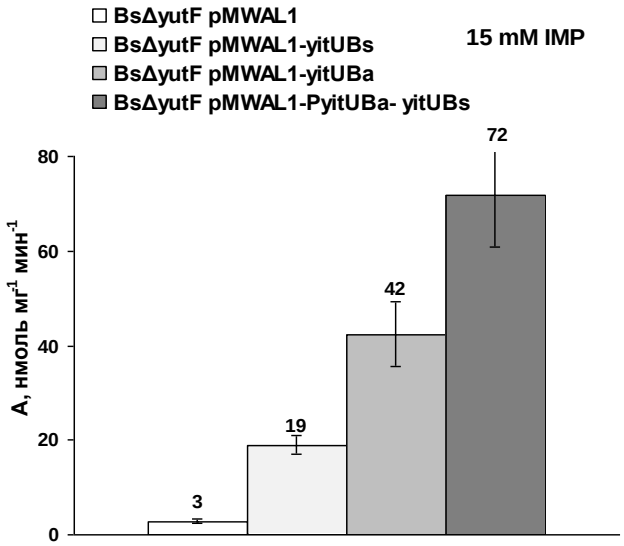


Рис. 54. Зависимость активности 5′-нуклеотидазы в отношении IMP (15 мМ) от уровня плазмидной экспрессии генов *yitU*. Активность измеряли в клеточных экстрактах штамма BsΔyutF, содержащем указанные плазмиды. Показаны средние значения трех независимых экспериментов и стандартное отклонение.

О накоплении рибофлавина в среде культивирования штаммами со сверхэкспрессией *yitU* также свидетельствовали результаты гало-теста на кормление штамма-ауксотрофа по рибофлавину, *B. subtilis* 168 Δ*rib,* которые показали, что гало роста клеток этого штамма появлялось в присутствии клеток, содержащих плазмиды для экспрессии гена *yitU,* и увеличивалось с ростом экспрессии гена *yitU* (Рис. 55).

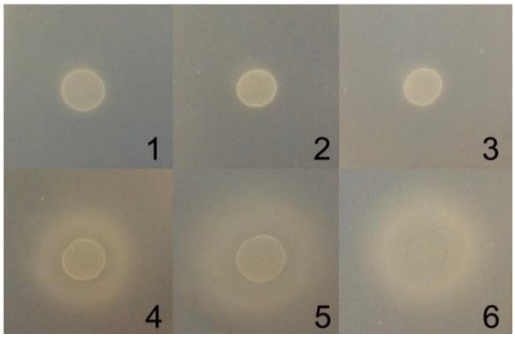


Рис. 55. Результаты гало-теста на кормление штамма-ауксотрофа по рибофлавину, *B. subtilis* 168 Δ*rib,* на минимальной агаризованной среде в присутствии штаммов: 1. BsΔyutF, 2. BsΔyutF ΔU, 3. BsΔyutF (pMWAL1), 4. BsΔyutF (pMWAL1-yitU$_{Bs}$), 5. BsΔyutF (pMWAL1-yitU$_{Ba}$), 6. BsΔyutF (pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$).

Прямое доказательство того, что окрашивание среды вызвано накапливающимся рибофлавином, было получено с помощью сравнительного LC-MS/MS анализа бесклеточных культуральных жидкостей, полученных после культивирования штаммов BsC^{+}, несущих пустой вектор pMWAL1 или плазмиду pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$ (Рис. 56). 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).

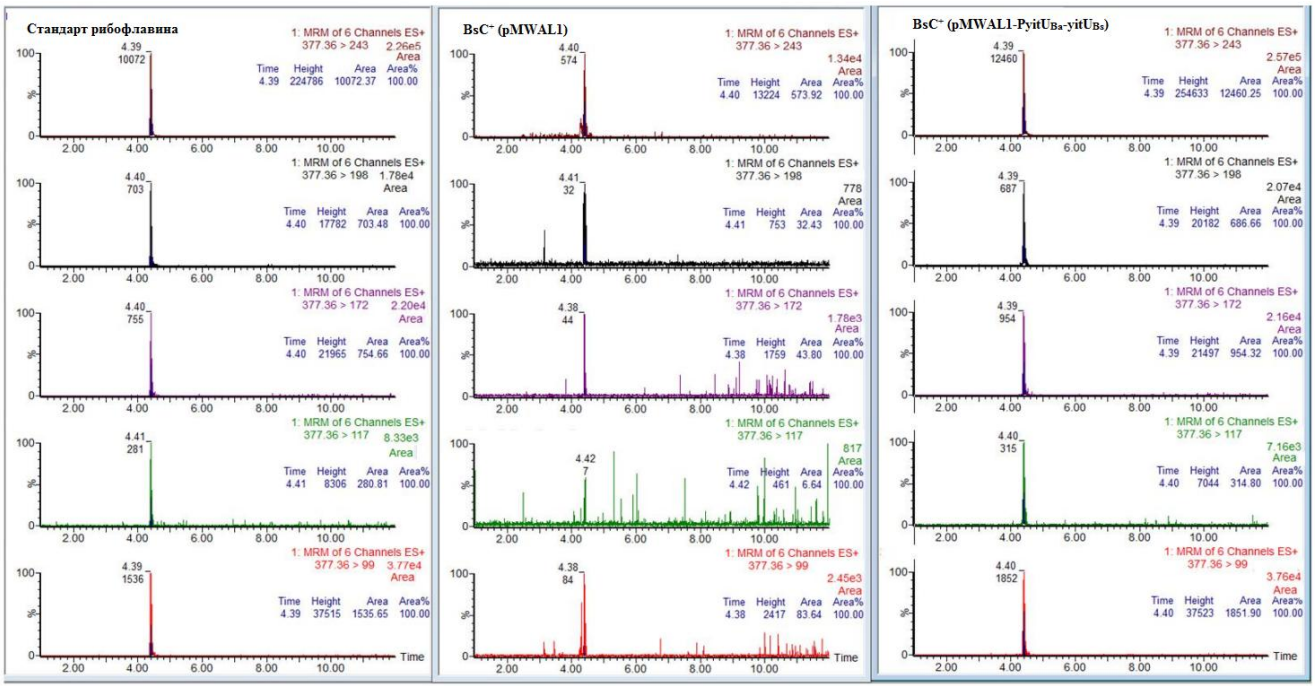


Рис. 56. LC-MS/MS анализ присутствия рибофлавина в культуральных жидкостях штаммов. Показаны хроматограммы переходов предшественник-продукт, 377→243, 377→198, 377→172, 377→117 и 377→99 для стандартов рибофлавина в растворе (0,45 мг/л) (**Стандарт рибофлавина**) и 10-ти кратно разведенных культуральных жидкостей штаммов BsC^+ (**pMWAL1**) и BsC^+ (**pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$**).

Изучение кинетики накопления рибофлавина в культуральных жидкостях клеток в зависимости от аллельного состояния гена *yitU* (делеция или сверхэкспрессия) показало, что штамм BsC^+ и его производный BsC^+ΔyitU не накапливали рибофлавин в обнаруживаемых с помощью HPLC количествах, тогда как штаммы BsC^+, содержащие плазмиды pMWAL1-yitU$_{Bs}$, pMWAL1-yitU$_{Ba}$ и pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$, накапливали в среде культивирования от 1 до 5 мг/л рибофлавина, пропорционально уровню экспрессии гена *yitU* (Рис. 57). Так, наиболее высокая экспрессия гена *yitU*$_{Bs}$ под контролем регуляторной области *yitU*$_{Ba}$ в штамме BsC^+ (pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$) приводила к почти пятикратному увеличению накопления рибофлавина по сравнению со штаммом (pMWAL1-yitU$_{Bs}$).

Необходимо упомянуть, что мы подробно не исследовали причину повышенного накопления рибофлавина при сверхэкспрессии *yitU* в штамме с делецией другого гена 5'-нуклеотидазы, *yutF* (см. Рис. 53). Можно предположить, что утрата функции YutF могла снизить гидролиз некоторых фосфорилированных метаболитов, участвующих в биосинтезе рибофлавина, например, XMP и/или GMP, повысив таким образом доступность важного предшественника в пути биосинтеза рибофлавина, GTP.

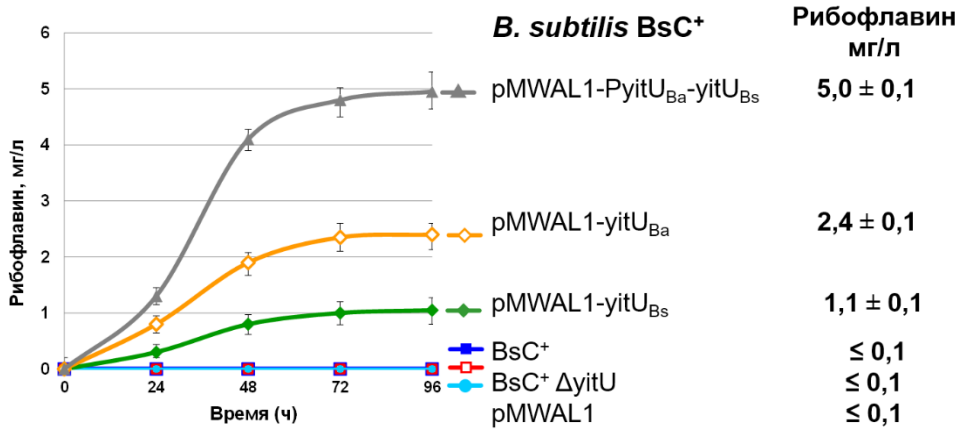


Рис. 57. Кинетика накопления рибофлавина штаммом *B. subtilis* BsC$^+$ в культуральной жидкости в зависимости от аллельного состояния гена *yitU*. Показаны средние значения tptx независимых экспериментов и стандартные отклонения.

Основываясь на представленных в предыдущих разделах данной работы свойствах сверхэкспрессии гена *yitU* и спектра субстратной специфичности его продукта, 5'-нуклеотидазы YitU, мы предположили, что эти свойства могут быть использованы для улучшения продукции рибофлавина, пуриновых нуклеозидов и AICAr соответствующими штаммами-продуцентами.

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 розеофлавину [*Mironov et al.*, 2002б] 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. 58, инактивация *yitU* в штамме Y25 снижала как накопление рибофлавина, так и скорость потребления глюкозы в продуктивной фазе, незначительно увеличивая накопление биомассы (Рис. 58 А, Б). Напротив, экспрессия *yitU* с плазмид pMWAL1-yitU$_{Bs}$ и pMWAL1-yitU$_{Ba}$ повышала накопление рибофлавина и немного увеличивала потребление глюкозы (Рис. 58 В, Г).

Интересно, что введение в штамм Y25 плазмиды pMWAL1-PyitU$_{Ba}$-yitU$_{Bs}$, которая, как было показано выше, поддерживает самый высокий уровень активности YitU (см. Рис. 54), приводило к серьезной задержке роста штамма (данные не представлены), скорее всего, из-за резкого дефицита в редокс-активных кофакторах FMN и FAD, обусловленного одновременным

нарушением активности бифункциональной флавокиназы / FAD-синтазы (*ribC1*) и усилением активности гидролазы FMN. Напротив, инактивация *yitU* на хромосоме штамма Y25 уменьшила накопление рибофлавина, но усилила рост клеток (Рис. 58 А, Б), скорее всего, из-за уменьшения превращения FMN в рибофлавин, что делает FMN и FAD более доступными для различных флавопротеинов, катализирующих важные окислительно-восстановительные реакции.

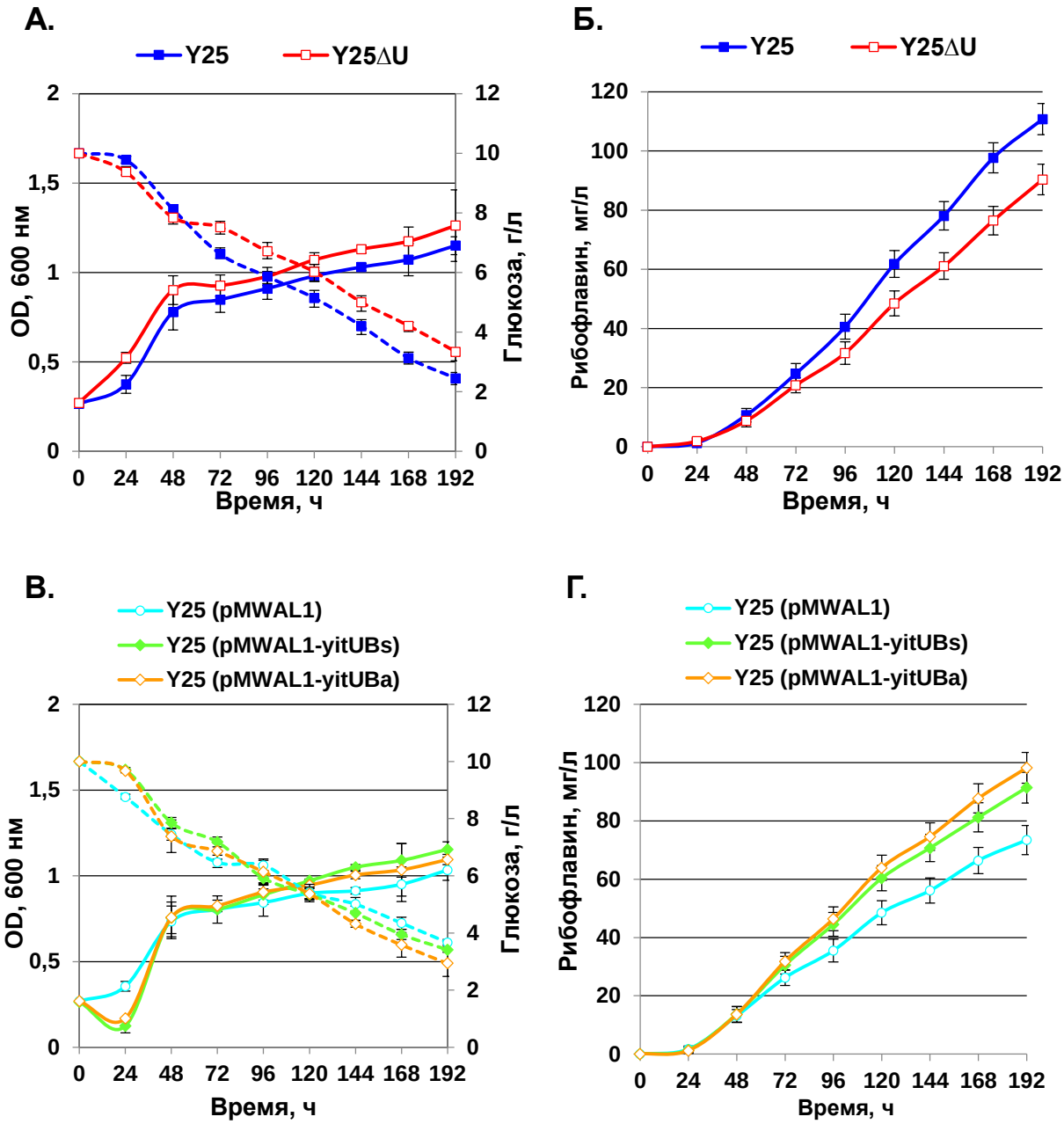


Рис. 58. Влияние уровня экспрессии гена *yitU* на продукцию рибофлавина в штамме-продуценте Y25. Показан эффект делеции **(А**, **Б)** и эффект сверхэкспрессии **(В**, **Г)** гена на рост клеток, потребление глюкозы (пунктирные линии) (**А**, **В**) и накопление рибофлавина (**Б**, **Г**). Показаны средние значения трех независимых экспериментов и стандартные отклонения.

Традиционно считалось, что дефосфорилирование ArPP не является узким местом в продукции рибофлавина даже у промышленных продуцентов, у которых сильно повышена экспрессия других генов биосинтеза рибофлавина [*Hümbelin et al*., 1999; *Perkins et* al., 1999]. 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 и значительно увеличивает накопление рибофлавина в штамме BsC^{+}, по сути, делая штамм дикого типа 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 ArPP), усилением конверсии FMN в рибофлавин и снижением пула FMN, что, в свою очередь, приводит к усилению транскрипции генов *rib*-оперона и активации его биосинтеза (Рис. 59). Особенно ярко этот эффект проявляется в штамме дикого типа, где, в отличие от продуцента Y25, нет сверхэкспрессии генов *rib*-оперона и дефицита активности рибофлавинкиназы.

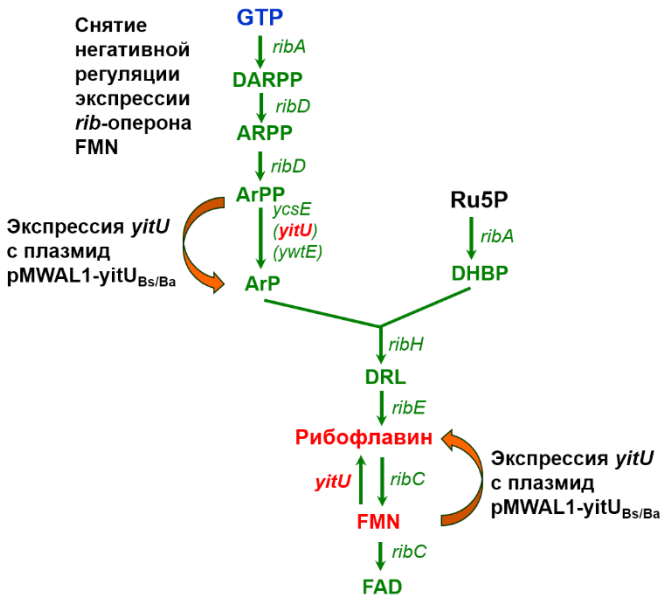


Рис. 59. Схематическое представление эффекта усиления экспрессии *yitU* на биосинтез рибофлавина.

4.2.3.2.2. Положительный эффект сверхэкспрессии *yitU* на продукцию пуриновых нуклеозидов и AICAr

Для изучения влияния уровня экспрессии гена *yitU* на продукцию пуриновых нуклеозидов и AICAr, в качестве модельных продуцентов выбрали штаммы AJ1991 и его производный штамм AJ1991purH::spc, соответственно.

Как было указано ранее, штамм AJ1991 является продуцентом инозина и гуанозина. Он может также накапливать небольшие количества других пуриновых нуклеозидов, в частности, AICAr. AJ1991purH::spc – это модельный продуцент AICAr, полученный в ходе данной работы путем инактивации гена *purH* на хромосоме AJ1991. Ген *purH* кодирует бифункциональный фермент AICAR-трансформилазу [EC 2.1.2.3] / IMP-циклогидролазу [EC 3.5.4.10], который осуществляет двухэтапное превращение AICAR в IMP в пути биосинтеза пуринов *de novo* (см. Рис. 11). Делеция этого гена приводит к внутриклеточному накоплению AICAR, который после дефосфорилирования экскретируется клеткой наружу в виде рибозида AICAr.

Как следует из Таблицы 17, 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 AICAr по сравнению со штаммом AJ1991 (pMWAL1), содержащим вектор без вставки (Таблица 17).

Таблица 17. Влияние уровня экспрессии гена *yitU* на накопление инозина, гуанозина и AICAr в штамме-продуценте AJ1991.

Штамм	**Инозин, г/л**	**Гуанозин, г/л**	**AICAr, г/л**	**Ксантозин, г/л**
AJ1991	3,25 ± 0,39	1,35 ± 0,39	≤ 0,01	-
AJ1991 Δ*yitU*	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-yitU$_{Ba}$)	**3,49 ± 0,11**	**1,90 ± 0,06**	**1,90 ± 0,17**	**0,12±0,01**

Примечания: Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение.

Основываясь на этих данных, а также на особенном поведении рекомбинантного белка Ht-YitU$_{Bs}$ при гидролизе AICAR, было изучено влияние делеции и сверхэкспрессии *yitU* на накопление AICAr штаммом-продуцентом, AJ1991purH::spc.

В процессе пробирочной ферментации мы оценивали кинетику роста клеток, потребления глюкозы и накопления AICAr у штаммов, производных AJ1991purH::spc, содержащих генетические модификации, приводящие к инактивации гена *yitU* или его сверхэкспрессии (Рис. 60, Таблица 18). Делеция *yitU* у AJ1991purH::spc практически не влияла на рост клеток, но резко снижала продукцию AICAr и, как следствие, скорость потребления глюкозы (Рис. 60, А, Б). Сверхэкспрессия *yitU*$_{Ba}$ восстанавливала накопление AICAr в штамме AJΔU, которое было утрачено из-за инактивации гена *yitU* на хромосоме (Рис. 60, Г). Более того, по сравнению с контрольным штаммом AJ1991purH::spc (pMWAL1), штамм со сверхэкспрессией *yitU*$_{Ba}$ (AJ1991purH::spc (pMWAL1-yitUBa)) продемонстрировал 1,5-кратное увеличение накопления AICAr (Рис. 60, Г), и снижение накопления биомассы, которое, тем не

менее, не привело к снижению скорости потребления глюкозы (Рис. 60, В), очевидно, из-за более активного биосинтеза целевого продукта.

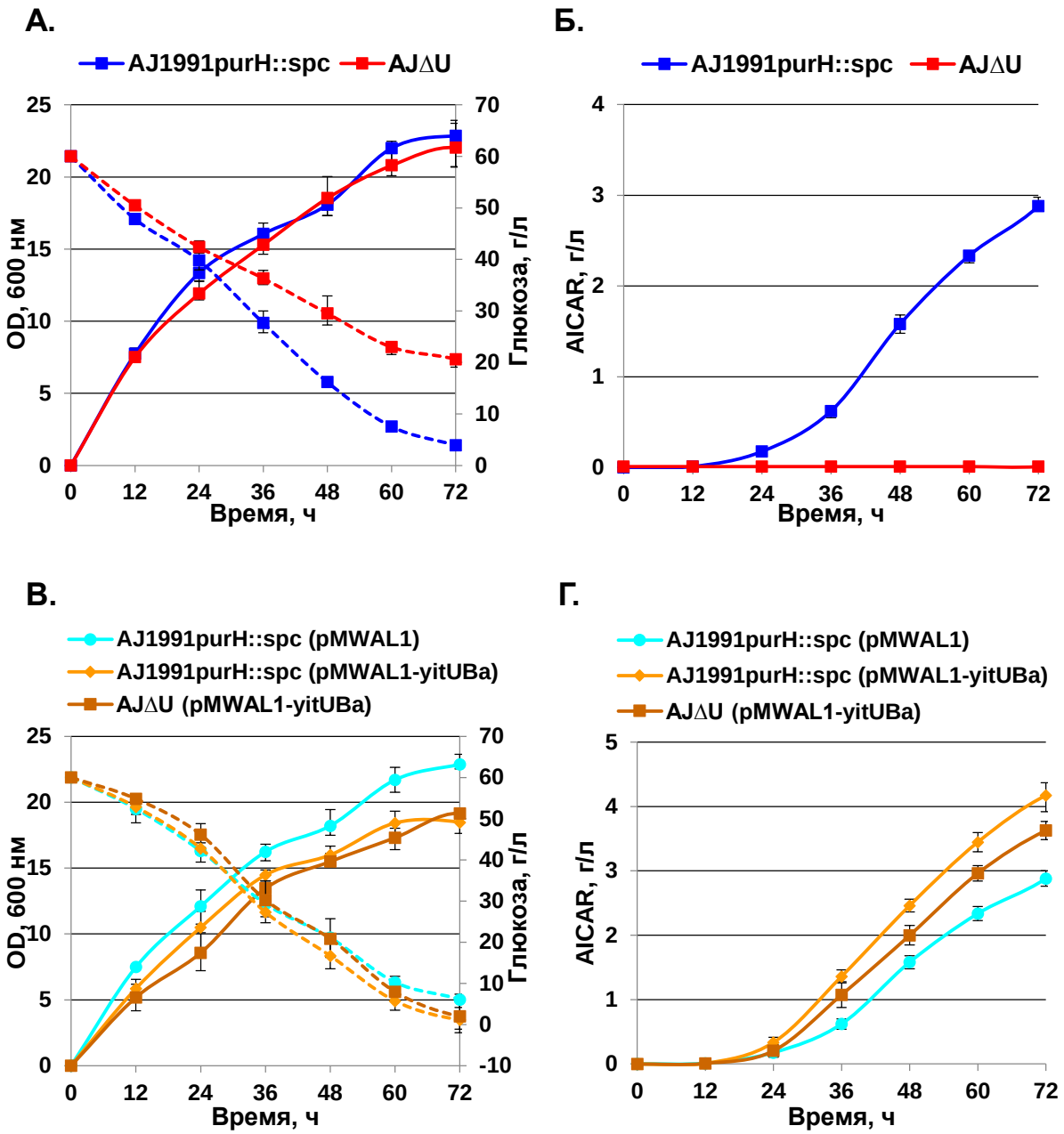


Рис. 60. Влияние уровня экспрессии гена *yitU* на продукцию AICAr в штамме-продуценте *B. amyloliquefaciens* AJ1991purH::spc: эффект делеции (**А**, **Б**) и сверхэкспрессии (**В**, **Г**) на рост клеток, потребление глюкозы (пунктирные линии) (**А**, **В**) и накопление AICAR (**Б**, **Г**). Показаны средние значения трех независимых экспериментов и стандартные отклонения.

Те же эффекты на рост, потребление глюкозы (данные не приведены) и накопление AICAr (Таблица 18) наблюдались у AJ1991purH::spc и AJΔU в случае экспрессии $yitU_{Bs}$ с плазмиды pMWAL1-yitU$_{Bs}$.

Таблица 18. Накопление биомассы и AICAr в конце пробирочной ферментации штаммами AJ1991purH::spc и его производными.

Штамм	**OD_{600}** 72 ч	**AICAr, г/л** 72 ч
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**

Примечания: Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение.

Выводы из раздела 4.2.3.

Таким образом, с использованием двух независимых подходов, один из которых был впервые предложен в данной работе, у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* были 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*. Продукты генов *yutF* и *yitU* проявляют специфичность к широкому спектру дезоксирибо- и рибонуклеозидмонофосфатов. Наиболее предпочтительными субстратами для рекомбинантного белка YutF являются R5P, 5'-XMP и PRPP, а YitU осуществляет гидролиз FMN и ArPP, участвуя, таким образом, в биосинтезе рибофлавина в *de novo* [*Sarge et al*., 2015] и *salvage* (из FMN) 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'-cAMP), найденные гены и их продукты, очевидно, принимают участие в регуляции пулов этих соединений, 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.

4.2.4. 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 важно 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 «разрегулированных» 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.

Как было подробно изложено в разделе «Обзор литературы», ряд генов и их продуктов, участвующих в активном транспорте аминокислот из клеток *E. coli,* были идентифицированы как в наших работах, так и в ряде других лабораторий. Однако 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.

Решению этих задач, а именно поиску и изучению генов систем активного транспорта пуриновых нуклеозидов из клеток *E. coli, B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* и посвящен данный раздел диссертационной работы.

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

Поиск генов с использованием прямой селекции на устойчивость к аналогам пуринов

В процессе нашей работы по поиску и изучению экспортеров аминокислот мы показали, что усиление экспрессии генов эффлюкса придает клеткам устойчивость к высоким концентрациям аминокислот и их аналогам, которые экскретируются продуктами этих генов, и этот фактор можно использовать для обнаружения соответствующих генов [*Zakataeva et al*., 1999; *Aleshin et al*., 1999б; *Livshits et al*., 2003б; *Kutukova et al*., 2005]. Аналогичный подход, а именно, селекция генов по устойчивости к аналогам пуриновых соединений, был применен в данной работе для поиска генов экспорта пуриновых соединений из клеток.

Поскольку продукты охарактеризованных в нашей и других лабораториях генов, отвечающих за выброс аминокислот, *rhtA*, *leuE* (*yeaS), ygaZH* и *ydeD* [*Zakataeva et al*., 1999; *Aleshin et al*., 1999б; *Livshits et al*., 2003а; *Kutukova et al*., 2005; *Tabolina et al*., 2005; *Park et al*., 2007; *Dassler et al*., 2000], обладали очень широкой субстратной специфичностью по отношению к целому ряду аминокислот и их аналогов, на начальном этапе работы мы проверили способность этих генов при сверхэкспрессии обеспечивать устойчивость к аналогам пуринов и увеличивать накопление пуринов в среде культивирования (Таблицы 19, 20). Оказалось, что гены-экспортеры аминокислот *rhtA, leuE, ygaZH* и *ydeD* при сверхэкспрессии не только сообщали клеткам устойчивость к аналогам пуринов, но и повышали накопление нуклеозидов в процессе культивирования (ферментации) модельного штамма-продуцента этих соединений, *E. coli* FADRadd (pMWKQamp).

Таблица 19. Эффект повышенной экспрессии генов *rhtA, leuE, ygaZH* и *ydeD* на рост штамма GS72 на среде М9 с добавлением аналогов пуринов.

Аналоги пуринов	**Конц., мкг мл$^{-1}$**	**Рост штамма GS72**				
		Повышенная экспрессия гена				
		Нет	*rhtA*	*leuE*	*ygaZH*	*ydeD*
Пурин	80	-	-	-	+	-
8-Азааденин	150	-	+	+	+	+
2,6-Диаминопурин	200	-	+	-	+	+
6-Меркаптопурин	150	-	+	-	+	-
6-Тиогуанин	300	-	+	+	+	+

«+» – хороший рост клеток; «-» – отсутствие роста

Таблица 20. Влияние повышенной экспрессии генов *rhtA, leuE ygaZH,* и *ydeD* в штамме-продуценте пуринов *E. coli* FADRadd (pMWKQamp) на накопление инозина, гуанозина и гипоксантина.

Штамм	Накопление в культуральной среде, г $л^{-1}$		
	Инозин	Гуанозин	Гипоксантин
FADRadd (pMWKQamp)	1,10±0,04	<0,02	0,29±0,03
FADRadd $rhtA_{23}$ (pMWKQamp)	1,50±0,01	<0,02	0,16±0,01
FADRadd $PnlpD_8$-yeaS (pMWKQamp)	1,40±0,06	<0,02	0,23±0,01
FADRadd Pl-ygaZH (pMWKQamp)	0,93±0,06	0,05±0,01	0,36±0,02
FADRadd $PnlpD_8$-ydeD (pMWKQamp)	1,33±0,06	<0,02	0,24±0,03

Примечания: Мутация $rhtA_{23}$ в 5' нетранслируемой области гена *rhtA* усиливает его экспрессию [*Livshits et al.*, 2003б]. Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение.

Эти данные могут указывать на участие белков RhtA, LeuE, YgaZ/YgaH и YdeD в экскреции не только различных аминокислот, но и пуриновых соединений, нуклеозидов и оснований. Такое проявление очень широкой субстратной специфичности было описано ранее для белков-экспортеров, обеспечивающих множественную лекарственную устойчивость благодаря транспорту из клеток целого ряда структурно несхожих антибиотиков и токсичных соединений [*Pitman et al*., 2000].

На следующем этапе с помощью отбора на устойчивость к аналогам пуринов провели поиск генов экспорта пуринов в банке генов *E. coli*.

Банк генов получали *in vivo* с использованием фазмиды и донорного штамма *E. coli* MG1655Mu (лизогенного по фагу Mu *c*ts62). Селекцию фазмид со вставками хромосомной ДНК вели по устойчивости к различным аналогам пуриновых оснований: 8-азааденину, 2,6-диаминопурину, 6-меркаптопурину, пурину, 6-тиогуанину. В результате была получена коллекция фазмид, сообщающих устойчивость к различным аналогам пуринов.

Секвенирование и минимизация вставок этих фазмид позволили выявить гены, которые отвечали за устойчивость к 8-азааденину: *ydeD*, а также новый ген *yijE*. Продукт гена YijE, так же, как и белки YdeD и RhtA, входят в семейство экспортеров DME (TC 2.A.7.3. The 10 TMS Drug/Metabolite Exporter Family), и устойчивость к аналогу пуринов за счет сверхэкспрессии *yijE* может быть следствием усиления экскреторной функции. Эффект сверхэкспрессии *yijE* на продукцию нуклеозидов был проверен в штамме-продуценте AJ13732 (FADRadd *edd yicP pgi xapA* (pMWKQ)). Этот штамм, сконструированный на основе FADRadd, содержит дополнительные мутации *edd, yicP, pgi* и *xapA*, увеличивающие продукцию нуклеозидов. Увеличение продукции инозина штаммом-продуцентом AJ13732 при усилении экспрессии *yijE* (штаммы со сверэкспрессией генов *rhtA* и *ydeD* использовали в этом эксперименте в качестве

положительного контроля), косвенно подтверждало участие этих генов в экскреции пуринов (Таблица 21). Однако наблюдаемый для генов *yijE* и *ydeD* эффект повышенного накопления инозина был слабо выражен, что говорит о том, что этот нуклеозид не является предпочтительным субстратом для соответствующих транспортных белков.

Таблица 21. Влияние усиления экспрессии генов *yijE*, *ydeD* и *rhtA* на накопление инозина штаммом-продуцентом *E. coli* AJ13732.

Штамм	**OD540**	**Инозин, г л$^{-1}$**
AJ13732 (pMWKQ)	5,4±0,2	6,3±0,4
AJ13732 (pMWKQ, pAYCTER3)	5,4±0,1	6,0±0,3
AJ13732*rhtA23* (pMWKQ)	4,7±0,3	8,8±0,5
AJ13732 (pMWKQ, pYIJE2)	5,3±0,3	6,5±0,4
AJ13732 (pMWKQ, pYDED3)	5,3±0,4	6,7±0,4

Примечания: Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение.

Дальнейший поиск генов экспорта пуриновых нуклеозидов был продолжен с использованием системы селекции по устойчивости к нуклеозидам в той же системе, что описана в разделе 4.2.3.1.2 для поиска генов 5'-нуклеотидаз. Поскольку штамм GS72 может расти на средах с пуриновыми нуклеозидами только при условии, что их присутствие не приведет к резкому увеличению пулов продуктов их фосфорилирования – нуклеотидов, мы предположили, что не только 5'-нуклеотидазная активность, усиленная амплификацией соответствующих генов, но и повышенная экскреция пуриновых нуклеозидов из клетки за счет амплификации генов-экспортеров позволит снять ингибирование роста GS72 на средах с инозином и гуанозином.

В качестве реципиента для отбора генов-экспортеров из коллекции генов, которые содержались в составе описанных ранее фазмид Mu d5005 и сообщали устойчивость к аналогам пуринов, использовали производный штамма GS72, лизогенизированный по Mu *c*ts62 (GS72Mu). На агаризованной среде М9 с добавлением 500 мкг мл$^{-1}$ инозина и/или 10 мкг мл$^{-1}$ гуанозина были отобраны трансформанты штамма GS72Mu, содержащие фазмиды со вставками фрагментов ДНК, обеспечивающими рост клеток в этих условиях.

Анализ вставок показал, что многие из них содержали гены метаболизма пуриновых производных (*amn, deoD, exo*), которые могли снимать ингибирование роста за счет деградации нуклеозидов и нуклеотидов. Однако поскольку данная задача заключалась в поиске генов, кодирующих белки транспорта пуринов из клетки, нас интересовали гены, кодирующие мембранные белки. Некоторые вставки содержали ген *ygaZ*, предположительное участие

которого в экспорте пуринов уже обсуждалось выше. Одна из отобранных фазмид, pMP1, обеспечивающая устойчивость одновременно к 6-меркаптопурину и инозину, содержала несколько генов, кодирующих предположительные мембранные белки с неизвестной функцией. Путем субклонирования было показано, что фенотип устойчивости обеспечивал фрагмент ДНК, содержащий ОРС *yicM* и 342 п. н. перед ее предполагаемым стартовым кодоном (GenBank U00096). Изучению гена *yicM* и функции его продукта, белка YicM посвящены последующие разделы этой работы.

4.2.4.1.1. Роль гена *yicM* и его продукта в экскреции нуклеозидов

Анализ нуклеотидной последовательности перед предполагаемой точкой начала трансляции ОРС *yicM* (Genbank, U00096) не выявил потенциального рибосом-связывающего сайта. Более того, изучение доступных баз данных выявило различия в позициях точки начала трансляции *yicM,* а, следовательно, и в размерах кодируемого белка (GenBank, NP 418118, 451 а. о.; SWISS-PROT, P31438, 412 а. о.; EcoGene, EG11689, 396 а. о.) (Рис. 61).

Для определения истинной точки начала трансляции предполагаемые стартовые кодоны были по отдельности инактивированы в составе плазмиды pYICM и было показано, что фенотип устойчивости к инозину утрачивался только в случае инактивации кодона ATG2 (Рис. 61). Этот результат, а также факт наличия последовательности, напоминающей сайт связывания рибосомы перед этим стартовым кодоном, показывают, что настоящим стартовым кодоном гена *yicM* является ATG2 (Рис. 61), и, следовательно, белок YicM состоит из 396 а. о., с расчетной молекулярной массой 41,85 кДа.

С помощью метода «primer-extension» установили точку старта транскрипции *yicM*, цитидин (С), расположенный на 32 п. н. выше стартового кодона гена (Рис. 61, Б). Кроме того, в 6 п. н. выше страта транскрипции была обнаружена последовательность (TAaAgT), напоминающая консенсусный элемент -10 (TATAAT) предполагаемого промотора, а на 19 п. н. выше этого элемента располагалась последовательность (TTaAat), напоминающая консенсусный элемент -35 области промотора (TTGACA) (Рис. 61, А).

Анализ последовательности YicM *in silico* показал, что это гидрофобный белок с 12 трансмембранными сегментами, принадлежащий к кластеру ортологичных групп (COG) №2814 [*Tatusov at al.,* 2003] и семейству 2.A.1.2. DHA1 (Drug:H^+ Antiporter-1) большого суперсемейства транспортных белков MFS [*Pao et al,* 1998; *Law et al.,* 2008], представители которого осуществляют вторичный транспорт различных соединений, используя протон-движущую силу. Принадлежащие COG №2814 гомологи YicM, YdeA из *E. coli* и YdhL (PbuE)

из *B. subtilis* описаны в литературе как экспортеры арабинозы [*Bost et al*., 1999] и пуриновых оснований [*Johansen et al*., 2003], соответственно.

А. **Б.**

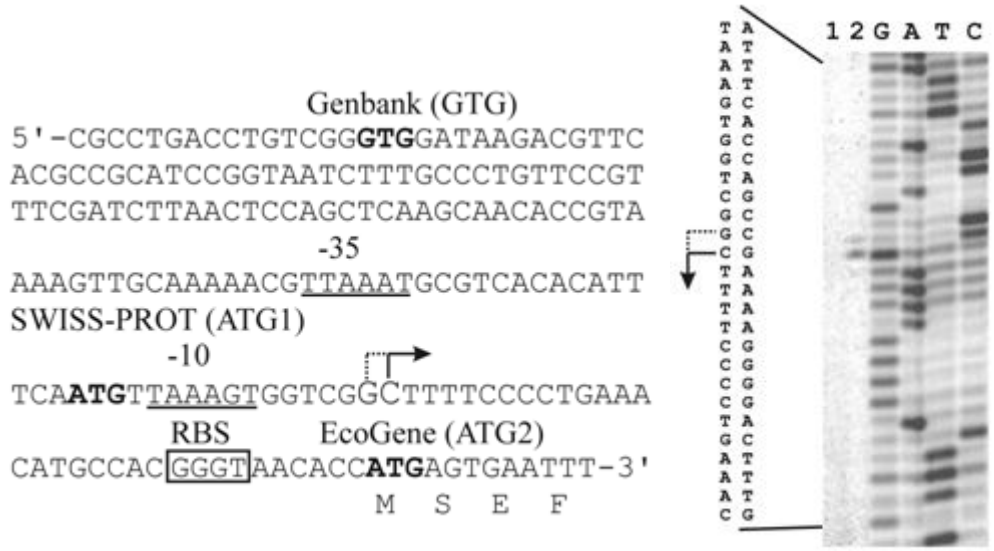


Рис. 61. А. Нуклеотидная последовательность регуляторной области гена *yicM*. Различные предполагаемые кодоны инициации трансляции показаны жирным шрифтом. Наиболее вероятный сайт связывания рибосом (RBS) заключен в рамку; –10 и –35 области промотора подчеркнуты; стрелка показывает старт и направление транскрипции. **Б.** Определение точки старта транскрипции *yicM*. кДНК транскрипты РНК, выделенной из штаммов TG1 (pOK12) (дорожка 1) и TG1 (pYICM1), (дорожка 2), анализировали в 6% полиакриламидном геле. Возможные точки начала транскрипции *yicM* (C и, менее предпочтительная, G) и направление транскрипции показаны стрелками.

Мы показали, что инактивация гена увеличивает чувствительность клеток к нуклеозидам (штамм GS72ΔyicM), в то время как его сверхэкспрессия с плазмиды (штамм GS72 (pYICM)) или хромосомы (штамм GS72P_{nlpD}-yicM), придает устойчивость к инозину, аденозину и гуанозину (Таблица 22),

Таблица 22. Влияние сверхэкспрессии или инактивации гена *yicM* на устойчивость клеток *E. coli* к 6-меркаптопурину и пуриновым нуклеозидам.

Штамм	**Минимальные ингибирующие концентрации (МИК), мкг мл$^{-1}$**			
	6-МП	**Инозин**	**Аденозин**	**Гуанозин**
GS72	150	300	500	10
GS72ΔyicM	150	100	100	7.5
GS72 (pYICM)	300	>30 000	>6000	50
GS72P_{nlpD}-yicM	300	>30000	>6000	100

Примечания: Показаны репрезентативные результаты от трех до пяти независимых экспериментов; 6-МП, 6-меркаптопурин.

Мы предположили, что YicM осуществляет функцию транспорта некоторых метаболитов из клеток, и пуриновые нуклеозиды можно рассматривать как его потенциальные субстраты. Для проверки этого предположения была проведена серия изложенных ниже экспериментов.

Сверхэкспрессия *yicM* замедляет рост штамма *E. coli* на пуриновых нуклеозидах в качестве единственного источника углерода

Клетки *E. coli* способны расти на нуклеозидах в качестве единственного источника углерода и энергии [*Nygaard*, 1983]. Поскольку при усилении экспрессии генов, отвечающих за эффлюкс определенных веществ, накопление этих веществ в клетках снижается [*Nikaido*, 1996], мы предположили, что если функция YicM действительно связана с экскрецией пуриновых нуклеозидов, то скорость роста штаммов с усиленной экспрессией *yicM* на минимальной среде с этими нуклеозидами в качестве единственных источников углерода также будет снижена за счет активации выброса этих соединений. Мы не обнаружили существенных различий в скорости роста для штаммов с диким геном *yicM* (MG1655) и изогенного штамма с инактивированным геном (MG1655Δ*yicM*) при росте на любых исследованных источниках углерода и энергии, а также для штамма со сверхэкспрессией *yicM* (MG1655P$_{nlpD}$-*yicM*) при росте на глюкозе, рибозе, цитидине и дезоксирибонуклеозидах (Рис. 62).

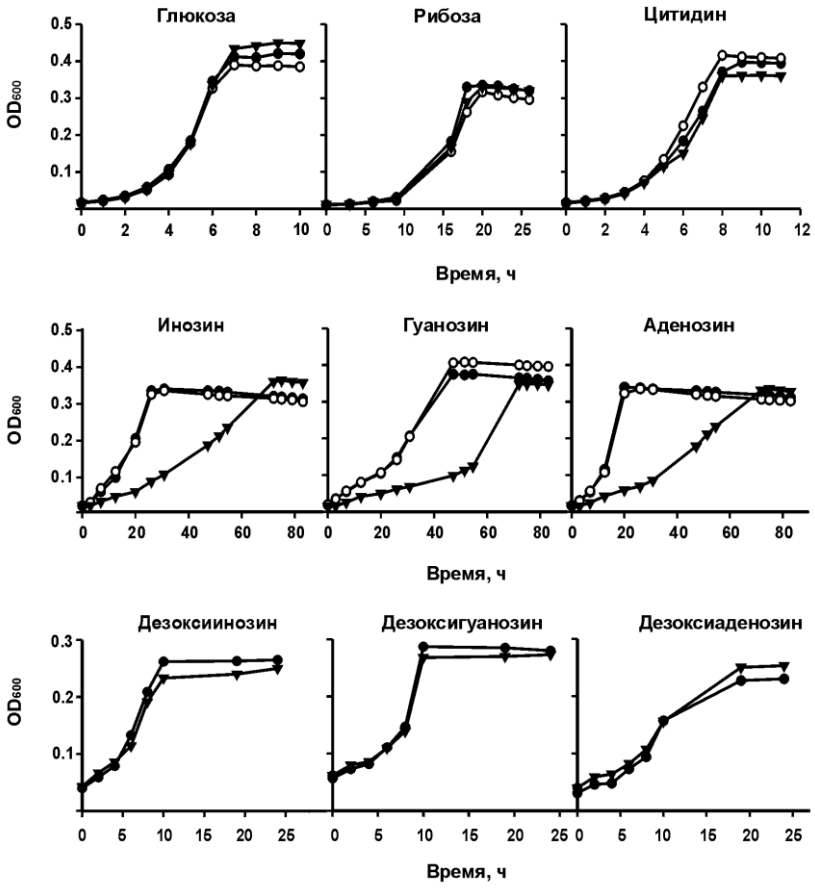


Рис. 62. Эффект сверхэкспрессии и инактивации гена *yicM* на рост штамма *E. coli* MG1655 на минимальной среде с различными источниками углерода (2 мМ). Закрашенные кружки – штамм MG1655, незакрашенные кружки – штамм MG1655Δ*yicM*, закрашенные треугольники – штамм MG1655P$_{nlpD}$-*yicM*. Каждый эксперимент был повторен не менее двух раз, и показаны репрезентативные результаты (отклонение составляло не более 5%).

При этом сверхэкспрессия *yicM* приводила к существенному снижению скорости роста штамма MG1655P$_{nlpD}$-*yicM* на пуриновых рибонуклеозидах, что подтверждает наше предположение об участии продукта гена *yicM*, транспортера YicM, в экспорте пуриновых нуклеозидов.

Сверхэкспрессия *yicM* увеличивает внеклеточное накопление инозина штаммом *E. coli* с нарушенной деградацией пуриновых рибонуклеозидов

Для получения прямых доказательств участия YicM в экскреции инозина сравнивали накопление пуриновых производных штаммами *E. coli* с нарушенной деградацией пуриновых нуклеозидов и различным уровнем экспрессии *yicM*. Известно, что вхождение клеток *E. coli* в стационарную фазу сопровождается деградацией рРНК и экскрецией азотистых оснований, которые являются продуктами превращения рибонуклеозидов ферментами нуклеозидфосфорилазами [*Rinas et al.*, 1995]. Мы предположили, что штаммы с неактивной пуриннуклеозидфосфорилазой (мутанты *deoD*) будут накапливать не пуриновые основания, а нуклеозиды, и при повышенной экспрессии гена, отвечающего за экскрецию пуриновых нуклеозидов из клетки, их 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 (Рис. 63).

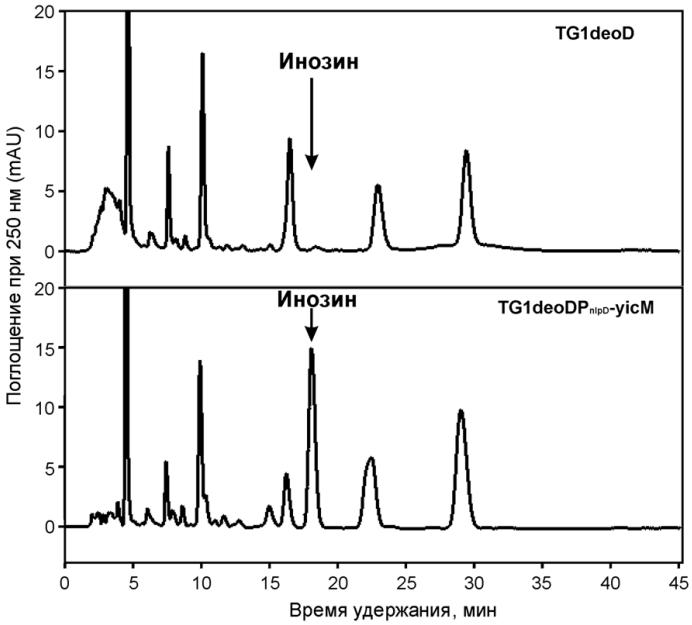


Рис. 63. Влияние сверхэкспрессии *yicM* на внеклеточное накопление инозина штаммом *E. coli* TG1deoD. Показаны профили элюирования культуральных супернатантов TG1deoD и TG1deoDP$_{nlpD}$-*yicM*.

Это повышенное накопление может быть результатом не только деградации рРНК, но также и результатом усиленного биосинтеза пуринов *de novo*, вызванного избыточной экскрецией инозина, снижением его внутриклеточных пулов и освобождением пути биосинтеза от негативной регуляции конечным продуктом, как на уровне экспрессии, так и на уровне активности ключевых ферментов.

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*. Для подтверждения снижения пулов пуриновых нуклеозидов в качестве «сенсора» внутриклеточной концентрации мы решили использовать уровень экспрессии оперона *deoCABD* с внутреннего промотора deoP3, который у *E. coli* индуцируется экзогенным инозином и гуанозином [*Valentin-Hansen et al.*, 1984]. Для оценки уровня экспрессии оперона, в качестве репортерного гена использовали *lacZ*. Активность β-галактозидазы определяли в присутствии пуриновых нуклеозидов в штамме GS224 (pMWF-deoP3) (который содержал хромосомные делеции *lacZ* и *deoD*, а также транскрипционное слияние промоторной области deoP3 и структурной части гена *lacZ* в составе плазмиды pMWF-deoP3), а также в изогенном штамме GS258 (pMWF-deoP3) со сверхэкспрессией гена *yicM* (P_{nlpD}-*yicM*). Было показано, что в соответствии с литературными данными, активность β-галактозидазы в штамме GS224 (pMWF-deoP3) действительно увеличивалась при добавлении в среду пуриновых нуклеозидов (в 3,3 и 2,2 раза при добавлении гуанозина и инозина/аденозина, соответственно). При этом сверхэкспрессия гена *yicM* существенно снижала этот эффект (Таблица 23). Эти данные указывают на то, что сверхэкспрессия *yicM* снижает внутриклеточную концентрацию пуриновых нуклеозидов и, таким образом, ослабляет индукцию оперона с промотора deoP3.

Таблица 23. Влияние сверхэкспрессии гена *yicM* на индукцию экспрессии пуриновыми нуклеозидами с промотора deoP3.

Штамм	**Статус *yicM***	**Активность β-галактозидазы, нмоль мин$^{-1}$ мг$^{-1}$**			
		без пуринов	**Инозин, 100 мкг мл$^{-1}$**	**Гуанозин, 100 мкг мл$^{-1}$**	**Аденозин, 100 мкг мл$^{-1}$**
GS224 (pMWF-deoP3)	Дикий тип	928±52	3078±86	2047±147	2053±61
GS258 (pMWF-deoP3)	P_{nlpD}-*yicM*	896±38	1272±103	1187±24	927±52

Примечания: Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение.

4.2.4.1.2. Положительный эффект сверхэкспрессии *yicM* на продукцию инозина в штаммах-продуцентах

Дальнейшее изучение влияния сверхэкспрессии гена *yicM* продолжили в штамме-продуценте пуриновых соединений, преимущественно инозина, 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. 64, 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. 64, А). Эти результаты дополнительно подтверждают участие YicM в экскреции инозина, а также указывают на то, что транспорт происходит за счет энергии мембранного потенциала.

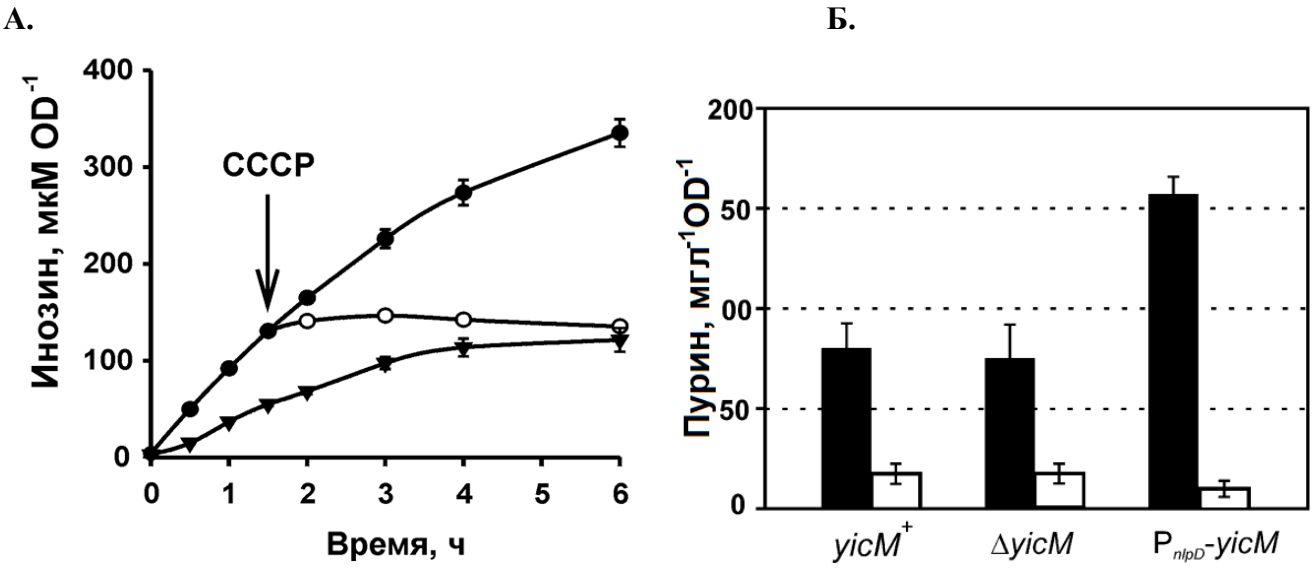


Рис. 64. Влияние сверхэкспрессии *yicM* на скорость экскреции (**А**) и продуктивность (**Б**) инозина. **А**. Накопление инозина в среде штаммами: FADRaddedd (pMWKQ) (закрашенные треугольники) и FADRaddeddP$_{nlpD}$-*yicM* (pMWKQ) (закрашенные кружки). Незакрашенные кружки показывают накопление инозина штаммом FADRaddeddP$_{nlpD}$-*yicM* (pMWKQ) после добавления 20 мкМ CCCP, момент добавления показан стрелкой. **Б**. Штаммы *E. coli* FADRaddedd (pMWKQ) (yicM+), FADRaddeddΔyicM (pMWKQ) (ΔyicM) и FADRaddeddP$_{nlpD}$-*yicM* (pMWKQ) (P$_{nlpD}$-yicM) культивировали в ферментационной среде 72 часа и затем определяли концентрацию инозина (закрашенные столбцы) и гипоксантина (незакрашенные столбцы) в среде в пересчете на биомассу, которую оценивали по оптической плотности культуры (OD). Показаны средние значения трех независимых экспериментов; планки погрешностей указывают на стандартные отклонения.

Концентрация инозина в пересчете на единицу биомассы (продуктивность), которую определяли после культивирования штаммов в ферментационной среде (Рис. 64, 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, возможно, свидетельствует о преимущественном выбросе нуклеозида по сравнению с основанием (Рис. 64, Б). Необходимо также отметить, что инактивация гена *yicM* не влияла на накопление инозина и гипоксантина, что согласуется с наличием других генов экспорта данных соединений из клетки, о которых шла речь в предыдущем разделе.

Совокупность полученных экспериментальных данных свидетельствует о транспортной функции YicM. Однако нельзя исключить предположение о том, что YicM, даже будучи мембранным белком, может являться, например, регуляторным белком-индуктором, активирующим продукцию неизвестного транспортного белка, который, в свою очередь, осуществляет экскрецию пуриновых рибонуклеозидов. Чтобы исключить это предположение, мы проверили, сохраняется ли функция продукта гена при его гетерологичной экспрессии в неродственном организме, регуляторные механизмы которого отличаются от таковых в *E. coli*. Оказалось, что положительное влияние усиления экспрессии гена *yicM* на накопление пуриновых нуклеозидов проявляется и в грамположительном организме, штамме-продуценте инозина и гуанозина *B. amyloliquefaciens* AJ1991, содержащего плазмиду pLF-yicM или инсерцию экспрессионной кассеты P*pur-yicM* в хромосомном локусе *aprE* (Таблица 24). Эти данные свидетельствует о том, что регуляторная функция YicM представляется маловероятной.

Таблица 24. 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 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.1
AJ1991 (pLF-yicM)	28.3	4.7 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.2
AJ1991Ppur-yicM	26.6	6.8$\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.2

Примечание: Показаны средние значения трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение.

4.2.4.1.3. Изучение регуляции экспрессии гена *yicM*

Изучение регуляции экспрессии с промотора *yicM* с помощью трансляционных слияний со структурной частью репортерного гена *lacZ* (на плазмиде pMWF-PyicM) показало, что экспрессия с промотора *yicM* существенно выше при росте штаммов на минимальной среде M9, а также в стационарной фазе роста (Рис. 65, А, В). Известно, что при вступлении в стационарную фазу роста транскрипция целого ряда генов регулируется σ^S-субъединицей РНК-полимеразы, продуктом гена *rpoS*. Мы показали, что экспрессия *yicM* снижена в штамме с инактивированным геном *rpoS* (Рис. 65, Б).

При росте на минимальной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода и энергии в отсутствии целого ряда питательных веществ повышается экспрессия многих генов, индуцирующихся, в том числе, и в стрессовых условиях (голодание, температурный, осмотический, тепловой шок и т. д). Похожий на *yicM* профиль экспрессии был нами ранее получен для генов *E. coli rhtB* и *rhtC*, продукты которых также кодируют экспортеры природных метаболитов, в данном случае аминокислот.

Известно, что экскреция и накопление клеточных метаболитов в культуральной жидкости необходимы для взаимодействия клеток в популяции. Можно предположить, что активация экспрессии генов экспорта при росте на минимальных средах и/или вступлении в стационарную фазу роста необходима для экскреции соединений, которые служат сигналами при межклеточных взаимодействиях. Производные пуринов могут служить такими сигнальными молекулами. Так, циклический аденозин-5'-фосфат (cAMP) играет важную роль в механизме катаболитной репрессии и межклеточной сигнализации, бис-(3'-5')-циклический димерный гуанозинмонофосфат (c-diGMP) регулирует взаимодействие клеток при образовании клеточных агрегатов и биопленок и, возможно, играет роль сигнала в межклеточных взаимодействиях [*Ullman and Danchin*, 1980; *Mann and Firtel*, 1993; *Jenal*, 2004]. Кроме того, как было отмечено ранее, при возникновении дефицита питательных веществ и замедлении синтеза белка в клетках происходит деградация рибосом и, как следствие этого, накопление в среде производных пуринов и пиримидинов [*Rinas et al*., 1995]. Возможно, что эти соединения, попадая в окружающую среду, служат сигналом для координированных реакций клеточной популяции, а экспортирующие их белки участвуют, таким образом, в коммуникативной функции клеток.

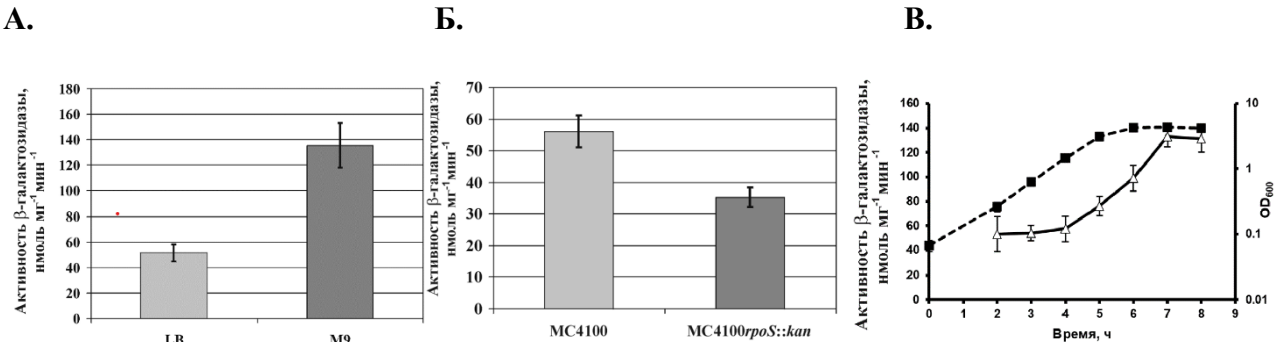


Рис. 65. Влияние состава питательной среды, LB и M9 (**А**), аллельного состояния гена *rpoS* в среде LB (**Б**) и фазы роста культуры в среде M9 (**В**) на экспрессию гена *yicM*. Культуры штаммов MC4100 (pMWF-P_{yicM}) (**А**), (**В**) и MC4100 (pMWF-P_{yicM}) и MC4100*rpoS*::*kan* (pMWF-P_{yicM}) (**Б**), выращенные в LB или M9, разводили в 50 раз в такой же среде и культивировали с аэрацией при 37 ^{o}C. В процессе роста отбирались пробы для определения оптической плотности культуры и измерения активности β-галактозидазы.

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»).

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

4.2.4.2.1. Роль гена *pbuE* и его продукта в экскреции пуриновых оснований и пуриновых нуклеозидов

Как уже отмечалось в разделе «Обзор литературы», к моменту начала исследований по теме данной диссертационной работы продукт гена *pbuE* (*ydhL*) из *B. subtilis* был охарактеризован как экспортер пуриновых оснований, аденина и гипоксантина [*Johansen et al.*, 2003; *Nygaard and Saxild*, 2005]. Однако сам белок PbuE и его функции были недостаточно хорошо изучены в этих работах, а участие белка в экспорте пуриновых оснований основывалось на ограниченном количестве данных. Поскольку *E. coli* Nep I и *B. subtilis* PbuE являются гомологичными белками [*Tatusov et al.*, 2003], мы предположили, что пуриновые нуклеозиды также могут быть субстратами для PbuE. Поэтому нашей задачей было исследовать возможное участие продукта гена *pbuE* в экскреции пуриновых нуклеозидов.

Мы показали, что ген *B. subtilis pbuE* ($pbuE_{BS}$), а также клонированный с помощью техники «shotgun» ортологичный ему ген из *B. amyloliquefaciens* ($pbuE_{BA}$) (нуклеотидная последовательность $pbuE_{BA}$ была определена в ходе данной работы и внесена в базу данных нуклеотидных последовательностей GenBank под регистрационным номером DQ662404), не только сообщали устойчивость к аналогам пуриновых оснований, но и придавали штамму GS72 устойчивость к ингибирующим концентрациям инозина, аденозина и гуанозина (Таблица 25), что может указывать на схожую с NepI экскреторную функцию в отношении пуриновых нуклеозидов.

Таблица 25. Сверхэкспрессия гена *pbuE* повышает устойчивость *E. coli* GS72 к пуриновым нуклеозидам.

Штамм	**Сверхэкспрессия гена *pbuE***	**МИК (мкг мл$^{-1}$)**		
		Инозин	**Гуанозин**	**Аденозин**
GS72 (pMW118)	нет	400	7.5	500
GS72 (pYDHL1)	$pbuE_{BS}$	>30000	10	>4000
GS72 (pYDHL2)	$pbuE_{BA}$	>30000	15	>4000
GS72 (pYDHL5)	$pbuE_{T\rightarrow C}$	>30000	25	>4000

Примечания: Показаны средние значения трёх независимых экспериментов ± стандартное отклонение

Необходимо отметить, что PbuE из *B. subtilis* и еще пять неохарактеризованных гомологичных белков, которые кодируются генами *ybcL, ytbD, yfhI, ywfA* и *yceJ,* входят в COG2814. Мы показали, что сверхэкспрессия генов-паралогов, *ybcL, ytbD, yfhI, ywfA* и *yceJ,* в отличие от *pbuE* не способна сообщать клеткам штамма GS72 устойчивость к пуриновым нуклеозидам (данные не приведены).

Ранее у *B. subtilis* была подробно изучена регуляция экспрессии гена *pbuE* по механизму аденин-зависимого рибопереключателя, или A-бокса [*Mandal and Breaker*, 2004]. Было показано, что экспрессия гена $pbuE_{BS}$ усиливается в присутствии аденина, а мутация T→C (U70→C) в последовательности A-бокса вызывает существенную дерепрессию экспрессии гена независимо от присутствия аденина [*Mandal and Breaker,* 2004]. 5' нетранслируемая область гена *B. amyloliquefaciens* $pbuE_{BA}$ содержит несколько нуклеотидных замен по сравнению с геном $pbuE_{BS}$. Однако мотив последовательности, образующий рибопереключатель, одинаков в обоих генах. Действительно, плазмида pYDHL5, содержащая замену T→C в последовательности рибопереключателя $pbuE_{BA}$ (положение -78 по отношению к стартовому кодону трансляции) придает штамму GS72 устойчивость к более высокой концентрации гуанозина по сравнению с pYDHL2, содержащей $pbuE_{BA}$ дикого типа (Таблица 25), что может свидетельствовать об усилении экспрессии гена благодаря мутации.

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 ($pbuE_{T\rightarrow C}$) гена с репортерным геном *lacZ,* лишенным регуляторных элементов и N-концевых а. о. ($pbuE_{BA}'$-'*lacZ* и $pbuE_{T\rightarrow C}'$-'*lacZ*), показало, что гетерологичная экспрессия гена *pbuE* в *E. coli* сохранила черты нативной регуляции, охарактеризованные ранее у *B. subtilis* [*Mandal and Breaker*, 2004], а именно, активацию экспрессии аденином и ее усиление благодаря мутации T→C (Рис. 66). Этот результат подтверждает независимость экспрессии *pbuE*, регулируемой рибопереключателем, от дополнительных регуляторных факторов, присущих клеткам бацилл.

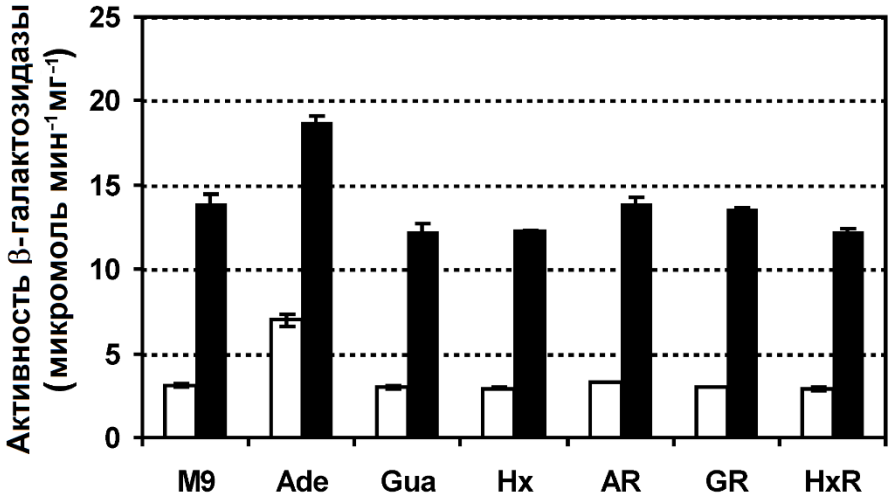


Рис. 66. Влияние пуринов в среде и мутации T→C на экспрессию трансляционных слияний *pbuE*$_{BA}$*′-′lacZ* и *pbuE*$_{T→C}$*′-′lacZ* у *E. coli.* Незакрашенные столбики, активность β-галактозидазы GS262 (pMWF1) (*pbuE*$_{BA}$*′-′lacZ*); закрашенные столбики – β-галактозидазная активность GS262 (pMWF2) (*pbuE*$_{T→C}$*′-′lacZ*) после культивирования на минимальной среде с глюкозой без добавления пуринов (M9), с аденином (Ade), гуанином (Gua), гипоксантином (Hx), аденозином (AR), гуанозином (GR), или инозином (HxR). Значения являются средними из трех экспериментов, планки погрешностей указывают на стандартные отклонения.

Экскреторная функция продукта гена *pbuE* в отношении пуриновых нуклеозидов была подтверждена в изложенных ниже экспериментах.

Сверхэкспрессия гена *pbuE* приводит к накоплению экзогенного инозина штаммом *E. coli* с нарушенной деградацией нуклеозидов

Как отмечалось выше, клетки *E. coli* в стационарной фазе роста выделяют в среду азотистые основания, продукты деградации рибонуклеозидов нуклеозидфосфорилазами [*Rinas et al*., 1995]. Поэтому *deoD* мутанты накапливают нуклеозиды вместо оснований, как это было показано выше в опыте с NepI (см. Рис. 63).

Аналогичный опыт был проведен для штаммов с повышенной экспрессией гена *pbuE*$_{BA}$. Как видно из Таблицы 26, штаммы с геном *deoD* дикого типа, TG1 (pMW118), TG1 (pYDHL2) и TG1 (pYDHL5), выращенные до стационарной фазы на минимальной среде, накапливали до 8 мкг/мл гипоксантина и следы инозина независимо от уровня экспрессии *pbuE*$_{BA}$. В тех же условиях штамм TG1deoD (pMW118), дефицитный по пуриннуклеозидфосфорилазе, не накапливал гипоксантина и инозина. Однако сверхэкспрессия *pbuE*$_{BA}$ в TG1deoD приводила к накоплению инозина штаммом TG1deoD (pYDHL2) до 14 мкг/мл. Дальнейшее усиление экспрессии *pbuE*$_{BA}$ за счет мутации T→C увеличивало накопление инозина до 27 мкг/мл.

Эти результаты показывают, что PbuE действительно способствует экскреции эндогенно образованного инозина в культуральную среду аналогично тому, как это было показано в отношении эффлюксной помпы NepI.

Таблица 26. Влияние сверхэкспрессии $pbuE_{BA}$ на накопление экзогенного гипоксантина и инозина штаммами *E. coli*.

Штамм	Сверхэкспрессия *pbuE*	Накопление пуринов (мкг мл$^{-1}$)	
		Гипоксантин	Инозин
TG1 (pMW118)	Нет	8.0±1.4	<0.5
TG1 (pYDHL2)	$pbuE_{BA}$	7.0±2.8	<0.5
TG1 (pYDHL5)	$pbuE_{T\rightarrow C}$	5.0±2.8	<0.5
TG1deoD (pMW118)	Нет	<0.5	<2.0
TG1deoD (pYDHL2)	$pbuE_{BA}$	<0.5	**14.0±1.4**
TG1deoD (pYDHL5)	$pbuE_{T\rightarrow C}$	<0.5	**27.0±4.0**

Примечания: Показаны средние значения трёх независимых экспериментов ± стандартное отклонение

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

Сверхэкспрессия гена *pbuE* усиливает экскрецию инозина и гуанозина в соответствующем штамме-продуценте на основе бацилл

Для изучения функции PbuE в нативном организме исследовали влияние уровня экспрессии $pbuE_{BA}$ на накопление экзогенных пуриновых нуклеозидов модельным продуцентом инозина и гуанозина *B. amyloliquefaciens* AJ1991. Было показано, что сверхэкспрессия $pbuE_{BA}$ увеличивала накопление инозина на 30–40%, а также, в меньшей степени, накопление гуанозина в среде культивирования. В то же время инактивация $pbuE_{BA}$ приводила к значительному снижению накопления инозина и особенно гуанозина в штамме AJ1991pbuE::cat (Рис. 67).

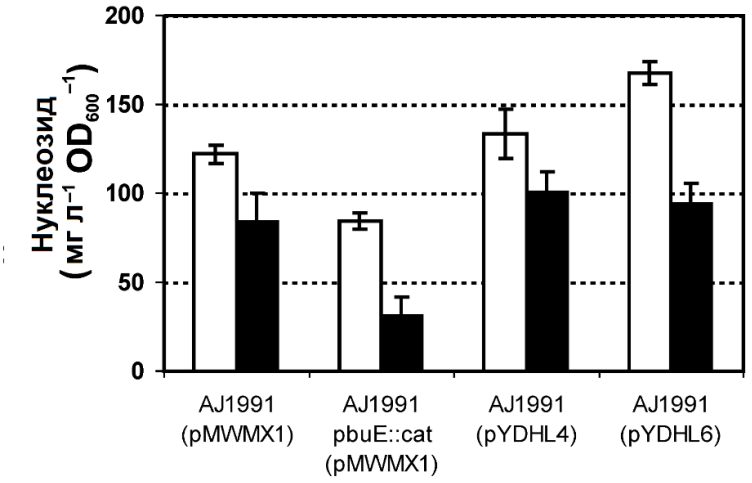


Рис. 67. Влияние уровня экспрессии $pbuE_{BA}$ на экзогенное накопление пуриновых производных штаммом *B. amyloliquefaciens*, продуцирующим нуклеозиды. Накопление пуриновых оснований и нуклеозидов в культуральной среде рассчитывали на единицу оптической плотности клеток при 600 нм. Значения являются средними из трех экспериментов; планки погрешностей указывают на стандартные отклонения. Незакрашенные столбики, накопление инозина; закрашенные столбики, накопление гуанозина.

Эти результаты показывают, что PbuE участвует в экскреции пуриновых нуклеозидов в клетках *Bacillus*, и его сверхэкспрессия может быть использована для увеличения накопления целевого продукта промышленных штаммов, продуцирующих пуриновые нуклеозиды.

Гетерологичная экспрессия гена *pbuE* усиливает экскрецию инозина и гипоксантина в соответствующих штаммах-продуцентах *E. coli*

Влияние гетерологичной экспрессии PbuE на накопление пуриновых производных было продемонстрировано в штамме-продуценте инозина на основе *E. coli*, FADRadd (pMWKQ), и в его производном *deoD*$^{+}$, GS192, штамме-продуценте гипоксантина. Как следует из Рисунка 68 А, повышение экспрессии *pbuE* увеличивало в соответствующих штаммах-продуцентах накопление инозина в 2 раза (Рис. 68, А), а гипоксатина на 66% (Рис. 68, Б).

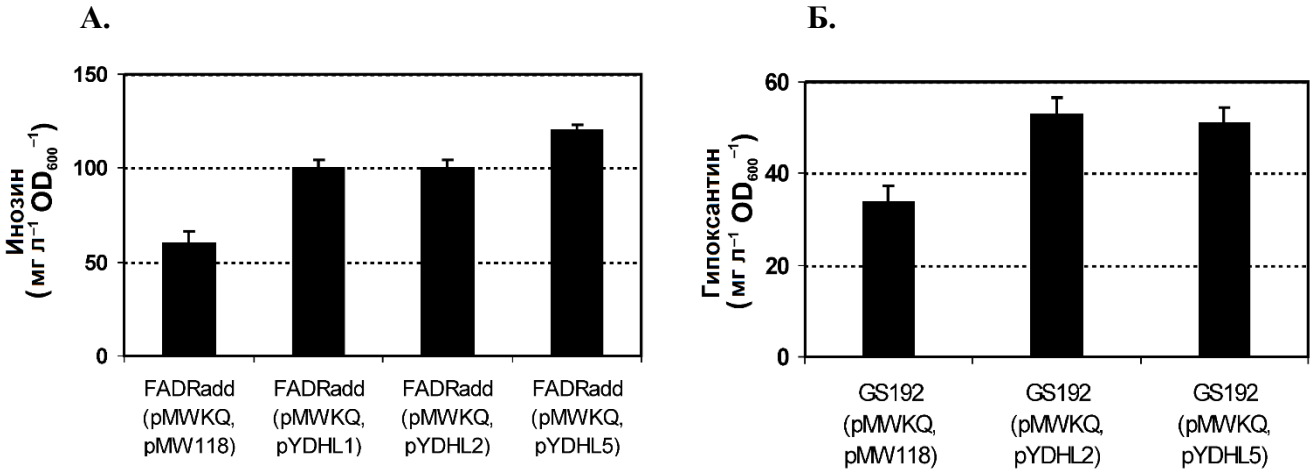


Рис. 68. Влияние уровня экспрессии $pbuE_{BA}$ на экзогенное накопление инозина (**А**) и гипоксантина (**Б**) соответствующими штаммами-продуцентами *E. coli*. Накопление пуриновых оснований и нуклеозидов в культуральной среде рассчитывали на единицу оптической плотности при 600 нм. Показаны средние значения трех экспериментов; планки погрешностей указывают на стандартные отклонения.

Эти данные свидетельствуют о том, что бациллярный *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 экспортеров была нами ранее отмечена при исследовании генов эффлюкса аминокислот и 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 AMP. Известно, что концентрация AMP коррелирует с энергетическим статусом клеток, выраженным в виде аденилатного энергетического заряда (ЭЗ) [*Chapman and Atkinson,* 1973; *Hardie and Hawley,* 2001]. ЭЗ может быть вычислен по формуле ([ATP] + 0,5 [ADP])/([ATP] + [ADP] + [AMP]), где в квадратных скобках указаны молярные концентрации соответствующих нуклеотидов. Резкое снижение ЭЗ фатально для клеток, и одним из способов стабилизации ЭЗ является увеличение мольной доли ATP и ADP за счет удаления AMP [*Chapman and Atkinson,* 1973]. У *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* AMP расщепляется до аденозина, а затем до аденина путем последовательного действия 5'-нуклеотидаз и пуриннуклеозидфосфорилаз. 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, предложенной Nygaard и Saxild [2005], PbuE можно рассматривать как часть механизма, который стабилизирует ЭЗ клетки.

Кроме того, эффлюкс пуриновых нуклеозидов у бацилл в комбинации с 5'-нуклеотидазной активностью (по аналогии с 5'-нуклеотидазой пиримидиновых нуклеотидов из *E. coli,* UmpH, функция которой подробно изложена в главе «Обзор литературы») может быть востребован в условиях нерегулируемого биосинтеза (сверхсинтеза) пуриновых нуклеотидов, чтобы избежать превышения их физиологических концентраций в клетке.

Выводы из раздела 4.2.4.

Показано, что охарактеризованные ранее гены эффлюкса аминокислот у *E. coli, rhtA, leuE* (*yeaS), ygaZH* и *ydeD*, а также новые идентифицированные гены *yijE* и *yicM* (*nepI*), при амплификации повышают устойчивость клеток *E. coli* к аналогам пуринов, а также увеличивают продукцию инозина штаммом-продуцентом *E. coli,* что указывает на их участие в экскреции пуринов. Определены точки начала транскрипции и трансляции гена *nepI*. Обнаружено, что экспрессия этого гена усиливается при росте клеток на минимальной среде M9, а также в стационарной фазе роста. Функции гена *nepI* были изучены более подробно. Впервые показано, что продукт гена, который принадлежит к суперсемейству транспортных белков MFS, при сверхэкспрессии в клетках *E. coli*, а также при гетерологичной экспрессии в штамме *B. amyloliquefaciens* AJ1991, повышает накопление инозина в среде культивирования и это накопление зависит от энергии трансмембранного потенциала. В совокупности, полученные

в работе данные указывают на то, что функция продукта *nepI* – эффлюкс пуриновых нуклеозидов из клеток, зависящий от мембранного потенциала.

Впервые показано, что гомологичный гену *nepI* ген *pbuE* из штаммов *Bacillus*, продукт которого описан ранее как эффлюксная помпа для пуриновых оснований [*Nygaard and Saxild*, 2005], участвует также в экскреции пуриновых нуклеозидов. Аденин является индуктором зависимой от рибопереключателя экспрессии *pbuE* не только в *B. subtilis*, но и в неродственном организме *E. coli*.

Сверхэкспрессия генов *nepI* и *pbuE* может быть успешно применена при конструировании штаммов-продуцентов нуклеозидов, в том числе и на основе неродственных микроорганизмов, где они сохраняют свои функции.

5. 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 AICAr, 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 рибопереключателя. 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.

6. ВЫВОДЫ

. 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 что нарушение негативной регуляции экспрессии генов пуринового оперона путём удаления последовательности, отвечающей за образование терминаторной шпильки гуанинового рибопереключателя, 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, предпочтительно 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 AICAr 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 AICAr.

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 рибопереключателя 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.

7. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лившиц В.А., Закатаева Н.П., Наканиши К., Алешин В.В., Трошин П.В., Токмакова И.Л. (2001). Фрагмент ДНК из *Escherichia coli*, определяющий повышенную продукцию аминокислот (варианты), и способ получения L-аминокислот. Патент РФ № 2175351.
2. Лобанов К.В., Королькова Н.В., Еремина С.Ю., Лопес Л.Э., Прошкин С.А., Миронов А.С. (2007). Мутации, приводящие к изменению специфичности сенсорной РНК, кодируемой геном *pbuE Bacillus subtilis*. Генетика 43:859-864.
3. Склярова С.А. Структурная организация и механизмы действия ФМН-зависимых рибопереключателей у бактерий. Диссертация, 2014.
4. Тараканов Б.В., Яковлева А.А., Николичева Т.А., Комкова Н.М., Манухина А.И., Алешин В.В. (2004). Экспрессионный вектор pLF22 для молочнокислых бактерий. Микробиология. №. 73, с.211-217.
5. Abbas C.A., Sibirny A.A. (2011). Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. Microbiol Mol Biol Rev. 75(2):321-60. https://www.doi.org/10.1128/MMBR.00030-10
6. Abriouel H., Franz C.M., Ben Omar N., Gálvez A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiol Rev. 35(1):201-32. https://www.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x
7. Aleshin V.V., Semenova E.V., Doroshenko V.G., Jomantas Y.V., Tarakanov B.V., Livshits V.A. (1999a). The broad host range plasmid pLF1311 from *Lactobacillus fermentum* VKM1311. FEMS Microbiol Lett. 178(1):47-53. https://www.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13758.x
8. Aleshin V.V., Zakataeva N.P., Livshits V.A. (1999б). A new family of amino-acid-efflux proteins. Trends Biochem Sci. 24(4):133-5. https://www.doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01367-5
9. Allen K.N., Dunaway-Mariano D. (2009). Markers of fitness in a successful enzyme superfamily. Curr Opin Struct Biol. 19:658-665. https://www.doi.org/10.1016/j.sbi.2009.09.008
10. Altenbuchner J. (2016). Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System. Appl Environ Microbiol. 82(17):5421-7. https://www.doi.org/10.1128/AEM.01453-16
11. Alves-Pereira I., Canales J., Cabezas A., Cordero P.M., Costas M.J., Cameselle J.C. (2008). CDP-alcohol hydrolase, a very efficient activity of the 5'-nucleotidase/UDP-sugar hydrolase encoded by the *ushA* gene of *Yersinia intermedia* and *Escherichia coli*. J Bacteriol. 190:6153-6161. https://www.doi.org/10.1128/JB.00658-08
12. Anagnostopoulos C., Spizizen J. (1961). Requirements for fransformation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 81(5):741-6. https://www.doi.org/10.1128/jb.81.5.741-746.1961

13. Antoniewski C., Savelli B., Stragier P. (1990). The spoIIJ gene, which regulates early developmental steps in *Bacillus subtilis*, belongs to a class of environmentally responsive genes. J Bacteriol. 172(1):86-93. https://www.doi.org/10.1128/jb.172.1.86-93.1990
14. Aravind L., Koonin E.V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. Trends Biochem Sci. 23(12):469-72. https://www.doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01293-6
15. Argov T., Rabinovich L., Sigal N., Herskovits A.A. (2017). An Effective Counterselection System for *Listeria monocytogenes* and Its Use To Characterize the Monocin Genomic Region of Strain 10403S. Appl Environ Microbiol. 83(6):e02927-16. https://www.doi.org/10.1128/AEM.02927-16
16. Arnvig K., Hove-Jensen B., Switzer R.L. (1990). Purification and properties of phosphoribosyl-diphosphate synthetase from *Bacillus subtilis*. Eur J Biochem. 192(1):195-200. https://www.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19214.x
17. 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. https://www.doi.org/10.1007/s00253-010-2646-8
18. Averianova L.A., Balabanova L.A., Son O.M., Podvolotskaya A.B., Tekutyeva L.A. (2020). Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. Front Bioeng Biotechnol. 8:570828. https://www.doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828
19. Bailey J.E. (1991) Toward a science of metabolic engineering. Science. 252(5013):1668-75. https://www.science.org/doi/10.1126/science.2047876
20. Barbe V., Cruveiller S., Kunst F., Lenoble P., Meurice G., Sekowska A. et al. (2009) From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. Microbiology (Reading). 155(Pt 6):1758-1775. https://www.doi.org/10.1099/mic.0.027839-0
21. Bazurto J.V., Heitman N.J., Downs D.M. (2015). Aminoimidazole Carboxamide Ribotide Exerts Opposing Effects on Thiamine Synthesis in *Salmonella enterica*. J Bacteriol. 197(17):2821–2830. https://doi.org/10.1128/JB.00282-15
22. Becker M.A., Smith P.R., Taylor W., Mustafi R., Switzer R.L. (1995). The genetic and functional basis of purine nucleotide feedback-resistant phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity. J Clin Invest. 96(5):2133-41. https://www.doi.org/10.1172/JCI118267
23. Belda E., Sekowska A., Le Fèvre F., Morgat A., Mornico D., Ouzounis C. et al. (2013). An updated metabolic view of the *Bacillus subtilis* 168 genome. Microbiology (Reading). 159(Pt 4):757-770. https://www.doi.org/10.1099/mic.0.064691-0

24. Belitsky B.R., Sonenshein A.L. (2011). CodY-mediated regulation of guanosine uptake in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 193(22):6276-87. https://www.doi.org/10.1128/JB.05899-11
25. Bellmann A., Vrljić M., Pátek M., Sahm H., Krämer R., Eggeling L. (2001). Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. Microbiology (Reading). 147(Pt 7):1765-1774. https://www.doi.org/10.1099/00221287-147-7-1765
26. Bengis-Garber C., Kushner D.J. (1981). Purification and properties of 5'-nucleotidase from the membrane of *Vibrio costicola*, a moderately halophilic bacterium. J Bacteriol. 146:24-32. https://www.doi.org/10.1128/JB.146.1.24-32.1981
27. Benowitz L.I., Goldberg D.E., Irwin N. (2002). Inosine stimulates axon growth *in vitro* and in the adult CNS. Prog Brain Res. 137:389–99. https://www.doi.org/10.1016/s0079-6123(02)37030-4
28. Bera A.K., Zhu J., Zalkin H., Smith J.L. (2003). Functional dissection of the *Bacillus subtilis* pur operator site. J Bacteriol. 185(14):4099-109. https://www.doi.org/10.1128/JB.185.14.4099-4109.2003
29. Berger S.A., Rowan K., Morrison H.D., Ziltener H.J. (1996). Identification of a bacterial inhibitor of protein kinases. Mechanism and role in host cell invasion. J Biol Chem. 271:23431-23437. https://www.doi.org/10.1074/jbc.271.38.23431
30. Biswas I., Gruss A., Ehrlich S.D., Maguin E. (1993). High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. J Bacteriol. 175(11):3628-35. https://www.doi.org/10.1128/jb.175.11.3628-3635.1993
31. Biswas T., Li Y., Aggarwal P., Wu J., Rubin J.R., Stuckey J.A. et al. (2009). The tail of KdsC: conformational changes control the activity of a haloacid dehalogenase superfamily phosphatase. J Biol Chem. 284(44):30594-603. https://www.doi.org/10.1074/jbc.M109.012278
32. Bloor A.E., Cranenburgh R.M. (2006). An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes. Appl Environ Microbiol. 72(4):2520-5. https://www.doi.org/10.1128/AEM.72.4.2520-2525.2006
33. Bost S., Silva F., Belin D. (1999). Transcriptional activation of *ydeA*, which encodes a member of the major facilitator superfamily, interferes with arabinose accumulation and induction of the *Escherichia coli* arabinose PBAD promoter. J Bacteriol. 181(7):2185-91. https://www.doi.org/10.1128/JB.181.7.2185-2191.1999
34. Bowers J.M., Bert-Moreno A. (2004). Treatment of HAART-induced lactic acidosis with B vitamin supplements. Nutr Clin Pract. 19(4):375-8. https://www.doi.org/10.1177/0115426504019004375

35. Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-54. https://www.doi.org/10.1006/abio.1976.9999
36. Brans A., Filée P., Chevigné A., Claessens A., Joris B. (2004). New integrative method to generate *Bacillus subtilis* recombinant strains free of selection markers. Appl Environ Microbiol. 70(12):7241-50. https://www.doi.org/10.1128/AEM.70.12.7241-7250.2004
37. Brooks J.E., Benner J.S., Heiter D.F., Silber K.R., Sznyter L.A, Jager-Quinton T. et al. (1989). Cloning the *Bam*HI restriction modification system. Nucleic Acids Res. 17(3):979-97. https://www.doi.org/10.1093/nar/17.3.979
38. Buhl E.S., Jessen N., Pold R., Ledet T., Flyvbjerg A., Pedersen S.B., [et al.] (2002). Long-term AICAR administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in rats displaying features of the insulin resistance syndrome. Diabetes. 51(7):2199-206. https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2199
39. Burroughs A.M., Allen K.N., Dunaway-Mariano D., Aravind L. (2006). Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. J Mol Biol. 361:1003-1034. https://www.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.049
40. Canosi U., Lüder G., Trautner T.A. (1982). SPP1-mediated plasmid transduction. J Virol. 44(2):431-6. https://www.doi.org/10.1128/JVI.44.2.431-436.1982
41. Cao G., Zhang X., Zhong L., Lu Z. (2011). A modified electro-transformation method for *Bacillus subtilis* and its application in the production of antimicrobial lipopeptides. Biotechnol Lett. 33(5):1047-51. https://www.doi.org/10.1007/s10529-011-0531-x
42. Cariani L., Thomas L., Brito J., del Castillo J.R. (2004). Bismuth citrate in the quantification of inorganic phosphate and its utility in the determination of membrane-bound phosphatases. Anal Biochem. 324(1):79-83. https://www.doi.org/10.1016/j.ab.2003.09.008
43. Casadaban M.J., Cohen S.N. (1979). Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. Proc Natl Acad Sci USA. 76(9):4530-3. https://www.doi.org/10.1073/pnas.76.9.4530
44. Chambert R., Pereira Y., Petit-Glatron M.F. (2003). Purification and characterization of YfkN, a trifunctional nucleotide phosphoesterase secreted by *Bacillus subtilis*. J Biochem. 134:655-660. https://www.doi.org/10.1093/jb/mvg189
45. Chang S., Cohen S.N. (1979). High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. Mol Gen Genet. 168(1):111-5. https://www.doi.org/10.1007/BF00267940

46. Chapman A.G., Atkinson D.E. (1973). Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. J Biol Chem. 1973 Dec 10;248(23):8309-12. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43229-8
47. Chen S., Tomchick D.R., Wolle D., Hu P., Smith J.L., Switzer R.L. et al. (1997). Mechanism of the synergistic end-product regulation of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase by nucleotides. Biochemistry. 36(35):10718-26. https://www.doi.org/10.1021/bi9711893
48. Chen X.H., Koumoutsi A., Scholz R., Eisenreich A., Schneider K., Heinemeyer I. et al. (2007a) Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Nat Biotechnol. 25(9):1007-14. https://www.doi.org/10.1038/nbt1325
49. Chen X.T., Ji J.B., Liu Y.C., Ye B., Zhou C.Y., Yan X. (2016). Artificial induction of genetic competence in *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. Biotechnol Lett. 38(12):2109-2117. https://www.doi.org/10.1007/s10529-016-2194-0
50. Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. (1956). Microdetermination of phosphorus. Anal. Chem. 28(11): 1756-1758. https://www.doi.org/10.1021/ac60119a033
51. Coimbra C.G., Junqueira V.B. (1971). High doses of riboflavin and the elimination of dietary red meat promote the recovery of some motor functions in Parkinson's disease patients. Braz J Med Biol Res. 36(10):1409-17. https://www.doi.org/10.1590/s0100-879x2003001000019
52. Coukoulis H., Campbell L.L. (1971) Transformation in *Bacillus amyloliquefaciens*. J Bacteriol. 105(1):319-22. https://www.doi.org/10.1128/jb.105.1.319-322.1971
53. Covington E.D., Gelbmann C.B., Kotloski N.J., Gralnick J.A. (2010). An essential role for UshA in processing of extracellular flavin electron shuttles by *Shewanella oneidensis*. Mol Microbiol 78:519-532. https://www.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07353.x
54. Cruz-Ramos H., Cook G.M., Wu G., Cleeter M.W., Poole R.K. (2004). Membrane topology and mutational analysis of *Escherichia coli* CydDC, an ABC-type cysteine exporter required for cytochrome assembly. Microbiology (Reading). 150(Pt 10):3415-27. https://www.doi.org/10.1099/mic.0.27191-0
55. Daignan-Fornier B., Pinson B. (2012). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranosyl 5'-Monophosphate (AICAR), a Highly Conserved Purine Intermediate with Multiple Effects. Metabolites. (2)2:292–302. https://doi.org/10.3390/metabo2020292
56. Dassler T., Maier T., Winterhalter C., Böck A. (2000). Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. Mol Microbiol. 36(5):1101-12. https://www.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01924.x

57. Datsenko K.A., Wanner B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(12):6640-5. https://www.doi.org/10.1073/pnas.120163297
58. Doroshenko V., Airich L., Vitushkina M., Kolokolova A., Livshits V., Mashko S. (2007). YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids. FEMS Microbiol Lett. 275(2):312-8. https://www.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00894.x
59. Ducker G.S., Rabinowitz J.D. (2015). ZMP: a master regulator of one-carbon metabolism. Mol Cell 57(2):203–204. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.012
60. Ebbole D.J., Zalkin H. (1987). Cloning and characterization of a 12-gene cluster from *Bacillus subtilis* encoding nine enzymes for *de novo* purine nucleotide synthesis. J. Biol. Chem. 262:8274-8287. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47560-6
61. Edwards A.M. (2014). Structure and general properties of flavins. Methods Mol Biol. 2014;1146:3-13. https://www.doi.org/10.1007/978-1-4939-0452-5_1
62. Eriksen T.A., Kadziola A., Bentsen A.K., Harlow K.W., Larsen S. (2000). Structural basis for the function of *Bacillus subtilis* phosphoribosyl-pyrophosphate synthetase. Nat Struct Biol. 7(4):303-8. https://www.doi.org/10.1038/74069
63. Eriksen T.A., Kadziola A., Larsen S. (2002). Binding of cations in *Bacillus subtilis* phosphoribosyldiphosphate synthetase and their role in catalysis. Protein Sci. 11(2):271-9. https://www.doi.org/10.1110/ps.28502
64. Fabret C., Ehrlich S.D., Noirot P. (2002). A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 46(1):25-36. https://www.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03140.x
65. Fan J., Zhang Y., Chuang-Smith O.N., Frank K.L., Guenther B.D., Kern M. et al. (2012). Ecto-5'-nucleotidase: a candidate virulence factor in *Streptococcus sanguinis* experimental endocarditis. PLoS One. 7(6):e38059. https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0038059
66. Firon A., Dinis M., Raynal B., Poyart C., Trieu-Cuot P., Kaminski P.A. (2014). Extracellular nucleotide catabolism by the Group B *Streptococcus* ectonucleotidase NudP increases bacterial survival in blood. J Biol Chem. 289:5479-89. https://www.doi.org/10.1074/jbc.M113.545632
67. Fischer M., Bacher A. (2005). Biosynthesis of flavocoenzymes. Nat Prod Rep. 22(3):324-50. https://www.doi.org/10.1039/b210142b
68. Fox I.H., Kelley W.N. (1971). Human phosphoribosylpyrophosphate synthetase. Distribution, purification, and properties. J Biol Chem. 246(18):5739-48. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61867-8

69. Franke I., Resch A., Dassler T., Maier T., Böck A. (2003). YfiK from *Escherichia coli* promotes export of O-acetylserine and cysteine. J Bacteriol. 185(4):1161-6. https://www.doi.org/10.1128/JB.185.4.1161-1166.2003
70. Gao L., Liu H., Ma Z., Han J., Lu Z., Dai C. et al. (2016). Translocation of the thioesterase domain for the redesign of plipastatin synthetase. Sci Rep. 6:38467. https://www.doi.org/10.1038/srep38467
71. Garavaglia S., Bruzzone S., Cassani C., Canella L., Allegrone G, Sturla L. et al. (2012). The high resolution crystal structure of periplasmic *Haemophilus influenzae* NAD nucleotidase reveals a novel enzymatic function of human CD73 related to NAD metabolism. Biochem J. 441:131-141. https://www.doi.org/10.1042/BJ20111263
72. Garen A., Levinthal C. (1960). A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. coli*. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. Biochim Biophys Acta. 38:470-83. https://www.doi.org/10.1016/0006-3002(60)91282-8
73. Gelfand M.S., Mironov A.A., Jomantas J., Kozlov Y.I., Perumov D.A. (1999). A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. Trends Genet. 15(11):439-42. https://www.doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01856-9
74. Gibson K.J., Schubert K.R., Switzer R.L. (1982). Binding of the substrates and the allosteric inhibitor adenosine 5'-diphosphate to phosphoribosylpyrophosphate synthetase from *Salmonella typhimurium*. J Biol Chem. 257(5):2391-6.
75. Glaser L., Melo A., Paul R. (1967). Uridine diphosphate sugar hydrolase. Purification of enzyme and protein inhibitor. J Biol Chem. 242(8):1944-54. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96092-8
76. Gomelsky M. (2011). cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all! Mol Microbiol. 79(3):562-5. https://www.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07514.x
77. Graf N., Wenzel M., Altenbuchner J. (2016). Identification and characterization of the vanillin dehydrogenase YfmT in *Bacillus subtilis* 3NA. Appl Microbiol Biotechnol. 100(8):3511-21. https://www.doi.org/10.1007/s00253-015-7197-6
78. Grandoni J.A., Switzer R.L., Makaroff C.A., Zalkin H. (1989). Evidence that the iron-sulfur cluster of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase determines stability of the enzyme to degradation *in vivo*. J Biol Chem. 264(11):6058-64. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83312-9
79. Groisman E.A., Casadaban M.J. (1986). Mini-mu bacteriophage with plasmid replicons for *in vivo* cloning and lac gene fusing. J Bacteriol. 168(1):357-64. https://www.doi.org/10.1128/jb.168.1.357-364.1986
80. Gruss A., Ehrlich S.D. (1989). The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. Microbiol Rev. 53(2):231-41. https://www.doi.org/10.1128/mr.53.2.231-241.1989

81. Gudkov S.V., Shtarkman I.N., Smirnova V.S., Chernikov A.V., Bruskov V.I. (2006). Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA *in vitro* from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice. Radiat Res. 165(5):538-45. https://www.doi.org/10.1667/RR3552.1
82. Gumina G., Song G., Chu C. (2001). L-Nucleosides as chemotherapeutic agents. FEMS Microbiol Lett. 202(1):9-15. https://www.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10773.x
83. Guo J., Lu Y., Dong H. (2006). HPLC-MS Analysis of the Riboflavin Crude Product of Semisynthesis. J Chromatogr Sci. 44(9):552-6. https://www.doi.org/10.1093/chromsci/44.9.552
84. Haase I., Sarge S., Illarionov B., Laudert D., Hohmann H.P., Bacher A. et al. (2013). Enzymes from the haloacid dehalogenase (HAD) superfamily catalyse the elusive dephosphorylation step of riboflavin biosynthesis. Chembiochem. 14:2272-2275. https://www.doi.org/10.1002/cbic.201300544
85. Hardie D.G., Hawley S.A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. Bioessays. 23(12):1112-9. https://www.doi.org/10.1002/bies.10009
86. Haskó G., Sitkovsky M.V., Szabó C. (2004). Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. Trends Pharmacol Sci. 25(3):152-7. https://www.doi.org/10.1016/j.tips.2004.01.006
87. Higashitsuji Y., Angerer A., Berghaus S., Hobl B., Mack M. (2007). RibR, a possible regulator of the *Bacillus subtilis* riboflavin biosynthetic operon, in vivo interacts with the 5'-untranslated leader of rib mRNA. FEMS Microbiol Lett. 274(1):48-54. https://www.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00817.x
88. Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene. 77(1):51-9. https://www.doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2
89. Hossain M.J., Ran C., Liu K., Ryu C.M., Rasmussen-Ivey C.R., Williams M.A., et al. (2015). Deciphering the conserved genetic *loci* implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum. Front Plant Sci. 6:631. https://www.doi.org/10.3389/fpls.2015.00631
90. Hove-Jensen B., Andersen K.R., Kilstrup M., Martinussen J., Switzer R.L., Willemoës M. (2016). Phosphoribosyl Diphosphate (PRPP): Biosynthesis, Enzymology, Utilization, and Metabolic Significance. Microbiol Mol Biol Rev. 81(1):e00040-16. https://www.doi.org/10.1128/MMBR.00040-16
91. Hove-Jensen B., Harlow K.W., King C.J., Switzer R.L. (1986). Phosphoribosylpyrophosphate synthetase of *Escherichia coli*. Properties of the purified enzyme and primary structure of the *prs* gene. J Biol Chem. 261(15):6765-71. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)62682-7

92. Huang M.M., Arnheim N., Goodman M.F. (1992). Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. Nucleic Acids Res. 20(17):4567-73. https://www.doi.org/10.1093/nar/20.17.4567
93. Hümbelin M., Griesser V., Keller T., Schurter W., Haiker M., Hohmann H.-P. et al. (1999). GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production. J Ind Microbiol Biotechnol. 22(1):1-7. https://www.doi.org/10.1038/sj.jim.2900590
94. Hürlimann H.C., Laloo B., Simon-Kayser B., Saint-Marc C., Coulpier F., Lemoine S. et al. (2011). Physiological and toxic effects of purine intermediate 5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide (AICAR) in yeast. J Biol Chem. 286(35):30994–31002. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.262659
95. Immormino R.M., Starbird C.A., Silversmith R.E., Bourret R.B. (2015). Probing mechanistic similarities between response regulator signaling proteins and haloacid dehalogenase phosphatases. Biochemistry. 54(22):3514-27. https://www.doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00286
96. Ishii K., Shiio I. (1972). Improved inosine production and derepression of purine nucleotide biosynthetic enzymes in 8-azaguanine resistant mutants of *Bacillus subtilis*. Agric Biol Chem. 36:1511–1522. https://www.doi.org/10.1080/00021369.1972.10860448
97. Itami H., Sakai Y., Shimamoto T., Hama H., Tsuda M., Tsuchiya T. (1989). Purification and characterization of membrane-bound 5'-nucleotidase of *Vibrio parahaemolyticus*. J Biochem. 105:785-789. https://www.doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122745
98. Ito M., Nagane M. (2001). Improvement of the electro-transformation efficiency of facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 by high osmolarity and glycine treatment. Biosci Biotechnol Biochem. 65(12):2773-5. https://www.doi.org/10.1271/bbb.65.2773
99. Iwasaki W., Miki K. (2007). Crystal structure of the stationary phase survival protein SurE with metal ion and AMP. J Mol Biol. 371:123-136. https://www.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.007
100. Jackson E.K. (2017). Discovery and roles of 2',3'-cAMP in biological systems. Non-canonical Cyclic Nucleotides. Handb Exp Pharmacol. 2017;238:229-252. https://www.doi.org/10.1007/164_2015_40
101. Janes B.K., Stibitz S. (2006). Routine markerless gene replacement in *Bacillus anthracis*. Infect Immun. 74(3):1949-53. https://www.doi.org/10.1128/IAI.74.3.1949-1953.2006
102. Jenal U. (2004). Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? Curr Opin Microbiol. 7(2):185-91. https://www.doi.org/10.1016/j.mib.2004.02.007

103. Jentsch S. (1983). Restriction and modification in *Bacillus subtilis*: sequence specificities of restriction/modification systems BsuM, BsuE, and BsuF. J Bacteriol. 1983;156(2):800-808. https://www.doi.org/10.1128/jb.156.2.800-808.1983

104. Jiang J., Gao L., Bie X., Lu Z., Liu H., Zhang C. et al. (2016). Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme.* BMC Microbiol. 16:31. https://www.doi.org/10.1186/s12866-016-0645-3

105. Jiménez A., Santos M.A., Revuelta J.L. (2008). Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase activity affects growth and riboflavin production in *Ashbya gossypii*. BMC Biotechnol. 8:67. https://www.doi.org/10.1186/1472-6750-8-67

106. Jinap S., Hajeb P. (2010). Glutamate. Its applications in food and contribution to health. Appetite. 55(1):1-10. https://www.doi.org/10.1016/j.appet.2010.05.002

107. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 337(6096):816-21. https://www.doi.org/10.1126/science.1225829

108. Johansen L.E., Nygaard P., Lassen C., Agersø Y., Saxild H.H. (2003). Definition of a second *Bacillus subtilis pur* regulon comprising the pur and xpt-pbuX operons plus *pbuG*, *nupG* (*yxjA*), and *pbuE* (*ydhL*). J Bacteriol. 185(17):5200-9. https://www.doi.org/10.1128/JB.185.17.5200-5209.2003

109. Jomantas J.A.V., Fiodorova J.A., Abalakina E.G., Kozlov Y.I. (1991). Genetics of *Bacillus amyloliquefaciens*. 6th International Conference on *Bacilli*, Stanford, Calif., abstr. no T7.

110. Kadziola A., Jepsen C.H., Johansson E., McGuire J., Larsen S., Hove-Jensen B. (2005). Novel class III phosphoribosyl diphosphate synthase: structure and properties of the tetrameric, phosphate-activated, non-allosterically inhibited enzyme from *Methanocaldococcus jannaschii*. J Mol Biol. 354(4):815-28. https://www.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.001

111. Kamada N., Yasuhara A., Takano Y., Nakano T., Ikeda M. (2001). Effect of transketolase modifications on carbon flow to the purine-nucleotide pathway in *Corynebacterium ammoniagenes*. Appl Microbiol Biotechnol. 56(5-6):710-7. https://www.doi.org/10.1007/s002530100738

112. Kast P., Hennecke H. (1991). Amino acid substrate specificity of *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase altered by distinct mutations. J Mol Biol. 222(1):99-124. https://www.doi.org/10.1016/0022-2836(91)90740-w

113. Kennerknecht N., Sahm H., Yen M.R., Pátek M., Saier Jr M.H.Jr, Eggeling L. (2002). Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. J Bacteriol. 184(14):3947-56. https://www.doi.org/10.1128/JB.184.14.3947-3956.2002

114. Koehler T.M., Thorne C.B. (1987). *Bacillus subtilis* (natto) Plasmid pLS20 Mediates Interspecies Plasmid Transfer. J Bacteriol. 169(11):5271-8. https://www.doi.org/10.1128/jb.169.11.5271-5278.1987

115. Koonin E.V., Tatusov R.L. (1994). Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. J Mol Biol. 244(1):125-32. https://www.doi.org/10.1006/jmbi.1994.1711

116. Koshiishi C., Crozier A., Ashihara H. (2001). Profiles of purine and pyrimidine nucleotides in fresh and manufactured tea leaves. J Agric Food Chem. 49(9):4378-82. https://www.doi.org/10.1021/jf0104679

117. Krath B.N., Hove-Jensen B. (2001). Implications of secondary structure prediction and amino acid sequence comparison of class I and class II phosphoribosyl diphosphate synthases on catalysis, regulation, and quaternary structure. Protein Sci. 10(11):2317-24. https://www.doi.org/10.1110/ps.11801

118. Kriel A., Bittner A.N., Kim S.H., Liu K., Tehranchi A.K., Zou W.Y. et al. (2012). Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. Mol Cell. 48(2):231-41. https://www.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.009

119. Kristich C.J., Chandler J.R., Dunny G.M. (2007). Development of a host-genotype-independent counterselectable marker and a high-frequency conjugative delivery system and their use in genetic analysis of *Enterococcus faecalis*. Plasmid. 57(2):131-44. https://www.doi.org/10.1016/j.plasmid.2006.08.003

120. Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V. et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtili*s. Nature. 390(6657):249-56. https://www.doi.org/10.1038/36786

121. Kuribayashi T.A., Fujii S., Masanari M., Yamanaka M., Wakai S., Sambongi Y. (2017). Difference in NaCl tolerance of membrane-bound 5'-nucleotidases purified from deep-sea and brackish water *Shewanella* species. Extremophiles. 21(2):357-368. https://www.doi.org/10.1007/s00792-016-0909-8

122. Kurihara K., Kashiwayanagi M. (2000). Physiological studies on umami taste. J Nutr. 130(4S Suppl):931S-4S. https://www.doi.org/10.1093/jn/130.4.931S

123. Kusaoke H., Hayashi Y., Kadowaki Y., Kimoto H. (1989). Optimum conditions for electric pulse-mediated gene transfer to *Bacillus subtilis* cells. Agric. Biol. Chem. 53:2441-2446. https://www.doi.org/10.1080/00021369.1989.10869689

124. Kutukova E.A., Livshits V.A., Altman I.P., Ptitsyn L.R., Zyiatdinov 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. https://www.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.031

125. Kuznetsova E., Proudfoot M., Gonzalez C.F., Brown G., Omelchenko M.V., Borozan I. et al. (2006). Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. J Biol Chem. 281:36149-36161. https://www.doi.org/10.1074/jbc.M605449200

126. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227(5259):680-685. https://www.doi.org/10.1038/227680a0

127. Lambrecht J.A., Flynn J.M., Downs D.M. (2012). Conserved YjgF protein family deaminates reactive enamine/imine intermediates of pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme reactions. J Biol Chem. 287(5):3454-61. https://www.doi.org/10.1074/jbc.M111.304477

128. Lapashina A.S., Feniouk B.A. (2019). Mutation Q259L in subunit beta in Bacillus subtilis ATP synthase attenuates ADP-inhibition and decreases fitness in mixed cultures. Biochem Biophys Res Commun. 509(1):102-107. https://www.doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.075

129. Larion M., Miller B.G. (2012). Homotropic allosteric regulation in monomeric mammalian glucokinase. Arch Biochem Biophys. 519(2):103–111. https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.11.007

130. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H. et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. BioInformatics. 23(21):2947–8. https://www.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404

131. Laurent T.C., Killander J. (1964). A theory of gel filtration and its experimental verification. J Chromatogr. 14:317–330. https://www.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)86637-6

132. Law C.J., Maloney P.C., Wang D.N. (2008). Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. Annu Rev Microbiol. 62:289-305. https://www.doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093329

133. Ledesma-Amaro R., Buey R.M., Revuelta J.L. (2015). Increased production of inosine and guanosine by means of metabolic engineering of the purine pathway in *Ashbya gossypii*. Microb Cell Fact. 14:58. https://www.doi.org/10.1186/s12934-015-0234-4

134. Lee J.S., Hyun K.W., Jeong S.C., Kim J.H., Choi Y.J., Miguez C.B. (2004). Production of ribonucleotides by autolysis of *Pichia anomala* mutant and some physiological activities. Can J Microbiol. 50(7):489-92. https://www.doi.org/10.1139/w04-032

135. Lee J.Y., Kwak J.E., Moon J., Eom S.H., Liong E.C., Pedelacq J.D. et al. (2001). Crystal structure and functional analysis of the SurE protein identify a novel phosphatase family. Nature Struct Biol. 8:789–794. https://www.doi.org/10.1038/nsb0901-789

136. Lee K.S., Song S.B., Kim K.E., Kim Y.H., Kim S.K., Kho B.H. et al. (2000). Cloning and characterization of the UDP-sugar hydrolase gene (*ushA*) of *Enterobacter aerogenes* IFO 12010. Biochem Biophys Res Commun. 269:526-531. https://www.doi.org/10.1006/bbrc.2000.2328

137. Li H., Zhang G., Deng A., Chen N., Wen T. (2011). *De novo* engineering and metabolic flux analysis of inosine biosynthesis in *Bacillus subtilis*. Biotechnol Lett. 33(8):1575-80. https://www.doi.org/10.1007/s10529-011-0597-5

138. Li S., Lu Y., Peng B., Ding J. (2007). Crystal structure of human phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1 reveals a novel allosteric site. Biochem J. 401(1):39-47. https://www.doi.org/10.1042/BJ20061066

139. Li Y., Wang H., Zhang L., Ding Z., Xu S., Gu Z. et al. (2020). Efficient Genome Editing in *Bacillus licheniformis* Mediated by a Conditional CRISPR/Cas9 System. Microorganisms. 8(5):754. https://doi.org/10.3390/microorganisms8050754

140. Liang R., Liu J. (2010). Scarless and sequential gene modification in *Pseudomonas* using PCR product flanked by short homology regions. BMC Microbiol. 10:209. https://www.doi.org/10.1186/1471-2180-10-209

141. Lim S.J., Jung Y.M., Shin H.D., Lee Y.H. (2002). Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned phbCAB operon. J Biosci Bioeng. 93(6):543-9. https://www.doi.org/10.1016/s1389-1723(02)80235-3

142. Liu L., Liu Y., Shin H.D., Chen R.R., Wang N.S., Li J. et al. (2013). Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology. Appl Microbiol Biotechnol. 97(14):6113-27. https://www.doi.org/10.1007/s00253-013-4960-4

143. Liu P., Pian Y., Li X., Liu R., Xie W., Zhang C. et al. (2014). *Streptococcus suis* adenosine synthase functions as an effector in evasion of PMN-mediated innate immunity. J Infect Dis. 210:35-45. https://www.doi.org/10.1093/infdis/jiu050

144. Liu S., Endo K., Ara K., Ozaki K., Ogasawara N. (2008). Introduction of marker-free deletions in *Bacillus subtilis* using the AraR repressor and the *ara* promoter. Microbiology. 154(Pt 9):2562-70. https://www.doi.org/10.1099/mic.0.2008/016881-0

145. Liu S., Hu W., Wang Z., Chen T. (2020). Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes. Microb Cell Fact. 19(1):31. https://www.doi.org/10.1186/s12934-020-01302-7

146. Liu X., Yang H., Zheng J., Ye Y., Pan L. (2017). Identification of strong promoters based on the transcriptome of *Bacillus licheniformis*. Biotechnol Lett. 39(6):873-881. https://www.doi.org/10.1007/s10529-017-2304-7

147. Livshits V.A., Vitushkina M.V., Mashko S.V., Doroshenko V.G., Biryukova I.V., Katashkina Z.I. et al. (2003a). Process for L-amino acid production with *Escherichia* (yddG) WO2003044192

148. Livshits V.A., Zakataeva N.P., Aleshin V.V., Vitushkina M.V. (2003б). Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*. Res Microbiol. 154(2):123-35. https://www.doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00036-6

149. Lobanov K.V., Errais Lopes L., Korol'kova N.V., Tyaglov B.V., Glazunov A.V., Shakulov R.S. et al. (2011). Reconstruction of Purine Metabolism in *Bacillus subtilis* to Obtain the Strain Producer of AICAR: A New Drug with a Wide Range of Therapeutic Applications. Acta Naturae. 3(2):79-89. https://www.doi.org/10.32607/20758251-2011-3-2-79-89

150. Lopez B.J.M., Campas M.C. Gil S.J. (2002). Therapeutic use of riboside of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (acadesine). US7560435 B2, 2002

151. Luo Z., Saha A.K., Xiang X., Ruderman N.B. (2005). AMPK, the metabolic syndrome and cancer. Trends Pharmacol Sci. 26:69–76. https://www.doi.org/10.1016/j.tips.2004.12.011

152. Ma F., Guo X., Fan H. (2016). Extracellular nucleases of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* degrade neutrophil extracellular traps and impair macrophage activity of the host. Appl Environ Microbiol. 83:e02468-16. https://www.doi.org/10.1128/AEM.02468-16

153. Mack M., van Loon A.P., Hohmann H.P. (1998). Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*. J Bacteriol. 180(4):950-5. https://www.doi.org/10.1128/JB.180.4.950-955.1998

154. Maguin E., Prévost H., Ehrlich S.D., Gruss A. (1996). Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. J Bacteriol. 178(3):931-5. https://www.doi.org/10.1128/jb.178.3.931-935.1996

155. Malykh E.A., Butov I.A., Ravcheeva A.B., Krylov A.A., Mashko S.V., Stoynova N.V. (2018). Specific features of L-histidine production by *Escherichia coli* concerned with feedback control of AICAR formation and inorganic phosphate/metal transport. Microb Cell Fact. 17(1):42. https://doi.org/10.1186/s12934-018-0890-2

156. Mandal M., Boese B., Barrick J.E., Winkler W.C., Breaker R.R. (2003). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and Other Bacteria. Cell. ;113(5):577-86. https://www.doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00391-x

157. Mandal M., Breaker R.R. (2004). Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. Nat Struct Mol Biol. 11(1):29-35. https://www.doi.org/10.1038/nsmb710

158. Mann S.K., Firtel R.A. (1993). cAMP-dependent protein kinase differentially regulates prestalk and prespore differentiation during *Dictyostelium* development. Development. 119(1):135-46. https://www.doi.org/10.1242/dev.119.1.135

159. Maresca M., Erler A., Fu J., Friedrich A., Zhang Y., Stewart A.F. (2010). Single-stranded heteroduplex intermediates in lambda Red homologous recombination. BMC Mol Biol. 11:54. https://www.doi.org/10.1186/1471-2199-11-54

160. Matsui H., Kawasaki H., Shimaoka M., Kurahashi O. (2001). Investigation of various genotype characteristics for inosine accumulation in *Escherichia coli* W3110. Biosci Biotechnol Biochem. 65(3):570-8. https://www.doi.org/10.1271/bbb.65.570

161. Matsui H., Sato K., Enei H., Hirose Y. (1979). Production of guanosine by psicofuranine and decoyinine resistant mutants of *Bacillus subtilis*. Agric Biol Chem. 43(8): 1739–1744. https://doi.org/10.1080/00021369.1979.10863695

162. McDonald I.R., Riley P.W., Sharp R.J., McCarthy A.J. (1995). Factors affecting the electroporation of *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 79(2):213–8. https://www.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb00937.x

163. McDonough E., Kamp H., Camilli A. (2016). *Vibrio cholerae* phosphatases required for the utilization of nucleotides and extracellular DNA as phosphate sources. Mol Microbiol. 99:453–69. https://www.doi.org/10.1111/mmi.13128

164. Meddeb-Mouelhi F., Dulcey C., Beauregard M. (2012). High transformation efficiency of *Bacillus subtilis* with integrative DNA using glycine betaine as osmoprotectant. Anal Biochem. 424(2):127-9. https://www.doi.org/10.1016/j.ab.2012.01.032

165. Mermershtain I., Finarov I., Klipcan L., Kessler N., Rozenberg H., Safro M.G. (2011). Idiosyncrasy and identity in the prokaryotic Phe-system: crystal structure of *E. coli* phenylalanyl-tRNA synthetase complexed with phenylalanine and AMP. Protein Sci. 20(1):160-7. https://www.doi.org/10.1002/pro.549

166. Meyer E., Switzer R.L. (1979). Regulation of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase activity by end products. J Biol Chem. 254(12):5397-402. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50609-8

167. Mihara Y., Utagawa T., Yamada H., Asano Y. (2000). Phosphorylation of nucleosides by the mutated acid phosphatase from *Morganella morganii*. Appl Environ Microbiol. 66(7):2811-6. https://www.doi.org/10.1128/AEM.66.7.2811-2816.2000

168. Miller J.H. (1972). Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

169. Mironov A.S., Gusarov I., Rafikov R., Lopez L.E., Shatalin K., Kreneva R.A. et al. (2002a). Sensing small molecules by nascent RNA: mechanism to control transcription in bacteria. Cell. 111(5):747-56. https://www.doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01134-0

170. Mironov A.S., Korolkova N.V., Errais L.L., Semenova L.E., Perumov D.A., Kreneva R.A. et al. (2002б). Method for preparing riboflavin, strains *Bacillus subtilis* as producers of riboflavin (variants) Application RU2002130592/13A

171. Miyazaki K. (2015). Molecular engineering of a PheS counterselection marker for improved operating efficiency in *Escherichia coli*. Biotechniques. 58(2):86-8. https://www.doi.org/10.2144/000114257

172. Mohapatra N.P., Balagopal A., Soni S., Schlesinger L.S., Gunn J.S. (2007). AcpA is a *Francisella* acid phosphatase that affects intramacrophage survival and virulence. Infect Immun. 75:390-396. https://www.doi.org/10.1128/IAI.01226-06

173. Mura C., Katz J.E., Clarke S.G., Eisenberg D. (2003). Structure and function of an archaeal homolog of survival protein E (SurE alpha): an acid phosphatase with purine nucleotide specificity. J Mol Biol. 326:1559-1575. https://www.doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00056-1

174. Nakamura J., Hirano S., Ito H., Wachi M. (2007). Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. Appl Environ Microbiol. 73(14):4491-8. https://www.doi.org/10.1128/AEM.02446-06

175. Nandineni M.R., Gowrishankar J. (2004). Evidence for an arginine exporter encoded by *yggA* (*argO*) that is regulated by the LysR-type transcriptional regulator ArgP in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 186(11):3539-46. https://www.doi.org/10.1128/JB.186.11.3539-3546.2004

176. Neu H.C. (1967). The 5'-nucleotidase of *Escherichia coli*. I. Purification and properties. J Biol Chem. 242:3896-3904. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)95832-1

177. Nicolas P., Mäder U., Dervyn E., Rochat T., Leduc A., Pigeonneau N. et al. (2012). Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. Science. 335(6072):1103-6. https://www.doi.org/10.1126/science.1206848

178. Nikaido H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science. 264(5157):382-8. https://www.doi.org/10.1126/science.8153625

179. Nikaido H. (1996). Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. J Bacteriol. 178(20):5853-9. https://www.doi.org/10.1128/jb.178.20.5853-5859.1996

180. Noirot P., Petit M.A., Ehrlich S.D. (1987). Plasmid replication stimulates DNA recombination in *Bacillus subtilis*. J Mol Biol. 196(1):39-48. https://www.doi.org/10.1016/0022-2836(87)90509-2

181. Nygaard P. (1983). Utilization of preformed purine bases and nucleosides. In: Metabolism of Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms (Munch-Petersen, A., Ed.). Academic Press, London. 27-93.

182. Nygaard P., Saxild H.H. (2005). The purine efflux pump PbuE in *Bacillus subtilis* modulates expression of the PurR and G-box (XptR) regulons by adjusting the purine base pool size. J Bacteriol. 187(2):791-4. https://www.doi.org/10.1128/JB.187.2.791-794.2005

183. Osaka N., Kanesaki Y., Watanabe M., Watanabe S., Chibazakura T., Takada H. et al. (2020). Novel (p)ppGpp^0 suppressor mutations reveal an unexpected link between methionine catabolism and GTP synthesis in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 113(6):1155-1169. https://www.doi.org/10.1111/mmi.14484

184. Pao S.S., Paulsen I.T., Saier M.H. Jr. (1998). Major facilitator superfamily. Microbiol Mol Biol. Rev. 62(1):1-34. 8. https://www.doi.org/10.1128/MMBR.62.1.1-34.1998

185. Pardee A.B., Yates R.A. (1956). Control of pyrimidine biosynthesis in *Escherichia coli* by a feed-back mechanism. J Biol Chem. 221(2):757-70. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65188-9

186. Park J.H., Lee K.H., Kim T.Y., Lee S.Y. (2007). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and *in silico* gene knockout simulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(19):7797-802. https://www.doi.org/10.1073/pnas.0702609104

187. Passariello C., Schippa S., Iori P., Berlutti F., Thaller M.C., Rossolini G.M. (2003). The molecular class C acid phosphatase of *Chryseobacterium meningosepticum* (OlpA) is a broad-spectrum nucleotidase with preferential activity on 5'-nucleotides. Biochim Biophys Acta. 1648:203-209. https://www.doi.org/10.1016/s1570-9639(03)00147-x

188. Pedrolli D.B., Kühm C., Sévin D.C., Vockenhuber M.P., Sauer U., Suess B. et al. (2015). A dual control mechanism synchronizes riboflavin and sulphur metabolism in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 112(45):14054-9. https://www.doi.org/10.1073/pnas.1515024112

189. Peifer S., Barduhn T., Zimmet S., Volmer D.A., Heinzle E., Schneider K. (2012). Metabolic engineering of the purine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* results in increased intracellular pool sizes of IMP and hypoxanthine. Microb Cell Fact. 11:138. https://www.doi.org/10.1186/1475-2859-11-138

190. Perkins J.B., Sloma A., Hermann T., Theriault K., Zachgo E., Erdenberger T. et al. (1999). Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 22:8–18. https://www.doi.org/10.1038/sj.jim.2900587

191. Peters J.M., Colavin A., Shi H., Czarny T.L., Larson M.H., Wong S. et al. (2016). A Comprehensive, CRISPR-based Functional Analysis of Essential Genes in Bacteria. Cell. 165(6):1493-1506. https://www.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.003

192. Petit M.A., Bruand C., Jannière L., Ehrlich S.D. (1990). Tn10-derived transposons active in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 172(12):6736-40. https://www.doi.org/10.1128/jb.172.12.6736-6740.1990

193. Putman M., van Veen H.W., Konings W.N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol Mol Biol Rev. 64(4):672-93. https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.672-693.2000

194. Pittman M.S., Corker H., Wu G., Binet M.B., Moir A.J., Poole R.K. (2002). Cysteine is exported from the *Escherichia coli* cytoplasm by CydDC, an ATP-binding cassette-type transporter required for cytochrome assembly. J Biol Chem. 277(51):49841-9. https://www.doi.org/10.1074/jbc.M205615200

195. Pold R., Jensen L. S., Jessen N., Buhl E. S., Schmitz O., Flyvbjerg A. et al. (2005). Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats. Diabetes. 54(4):928–934. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.4.928

196. Porter C.M., Miller B.G. (2012). Cooperativity in Monomeric Enzymes with Single Ligand-Binding Sites. Bioorg Chem. 43:44–50. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.11.001

197. Price M.A., Cruz R., Bryson J., Escalettes F., Rosser S.J. (2020). Expanding and understanding the CRISPR toolbox for *Bacillus subtilis* with MAD7 and dMAD7. Biotechnol Bioeng. 117(6):1805-1816. https://www.doi.org/10.1002/bit.27312

198. Proudfoot M., Kuznetsova E., Brown G., Rao N.N., Kitagawa M., Mori H. et al. (2004). General enzymatic screens identify three new nucleotidases in *Escherichia coli*. Biochemical characterization of SurE, YfbR, and YjjG. J Biol Chem. 279:54687-54694. https://www.doi.org/10.1074/jbc.M411023200

199. Punj V., Zaborina O., Dhiman N., Falzari K., Bagdasarian M., Chakrabarty A.M. (2000). Phagocytic cell killing mediated by secreted cytotoxic factors of *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 68:4930-4937. https://www.doi.org/10.1128/iai.68.9.4930-4937.2000

200. Qiu Y., Zhu Y., Sha Y., Lei P., Luo Z., Feng X. et al. (2020). Development of a Robust *Bacillus amyloliquefaciens* Cell Factory for Efficient Poly(γ-glutamic acid) Production from Jerusalem Artichoke. ACS Sustainable Chem Eng. 8(26):9763-9774. https://www.doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c02107

201. Rahmer R., Morabbi H.K., Altenbuchner J. (2015). Construction of a Super-Competent *Bacillus subtilis* 168 Using the P mtlA -comKS Inducible Cassette. Front Microbiol. 6:1431. https://www.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01431

202. Rappu P., B. Shin B.S., Zalkin H., Mäntsälä P. (1999). A role for a highly conserved protein of unknown function in regulation of *Bacillus subtilis purA* by the purine repressor. J Bacteriol. 181(12):3810-5. https://www.doi.org/10.1128/JB.181.12.3810-3815.1999

203. Rathbone M., Pilutti L., Caciagli F., Jiang S. (2008). Neurotrophic effects of extracellular guanosine. Nucleos Nucleot Nucl. 27(6):666-72. https://www.doi.org/10.1080/15257770802143913

204. Rattan R., Giri S., Singh A.K., Singh I. (2005). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo* via AMP-activated protein kinase. J Biol Chem. 280(47):39582-93. https://doi.org/10.1074/jbc.M507443200

205. Reaves M.L., Young B.D., Hosios A.M., Xu Y.F., Rabinowitz J.D. (2013). Pyrimidine homeostasis is accomplished by directed overflow metabolism. Nature. 500:237-241. https://www.doi.org/10.1038/nature12445

206. Reilly T.J., Calcutt M.J. (2004). The class C acid phosphatase of *Helicobacter pylori* is a 5' nucleotidase. Protein Expr Purif. 33:48-56. https://www.doi.org/10.1016/j.pep.2003.08.020

207. Reilly T.J., Chance D.L., Calcutt M.J., Tanner J.J., Felts R.L., Waller S.C. et al. (2009). Characterization of a unique class C acid phosphatase from *Clostridium perfringens*. Appl Environ Microbiol. 75:3745-3754. https://www.doi.org/10.1128/AEM.01599-08

208. Reilly T.J., Chance D.L., Smith A.L. (1999). Outer membrane lipoprotein e (P4) of *Haemophilus influenzae* is a novel phosphomonoesterase. J Bacteriol. 181:6797-6805. https://www.doi.org/10.1128/JB.181.21.6797-6805.1999

209. Reilly T.J., Felts R.L., Henzl M.T., Calcutt M.J., Tanner J.J. (2006). Characterization of recombinant *Francisella tularensis* acid phosphatase. A. Protein Expr Purif. 45:132-141. https://www.doi.org/10.1016/j.pep.2005.05.001

210. Rempel S., Stanek W.K., Slotboom D.J. (2019). ECF-Type ATP-Binding Cassette Transporters. Annu Rev Biochem. 88:551-576. https://www.doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111705

211. Ren J., Kotaka M., Lockyer M., Lamb H.K., Hawkins A.R., Stammers D.K. (2005). GTP cyclohydrolase II structure and mechanism. J Biol Chem. 280(44):36912-9. https://www.doi.org/10.1074/jbc.M507725200

212. Ridder I.S., Dijkstra B.W. (1999). Identification of the Mg2+-binding site in the P-type ATPase and phosphatase members of the HAD (haloacid dehalogenase) superfamily by structural similarity to the response regulator protein CheY. Biochemical J. Biochem J. 339 (Pt 2)(Pt 2):223-6. https://www.doi.org/10.1042/bj3390223

213. Rinas U., Hellmuth K., Kang R., Seeger A., Schlieker H. (1995). Entry of *Escherichia coli* into stationary phase is indicated by endogenous and exogenous accumulation of nucleobases. Appl Environ Microbiol. 61(12):4147-51. https://www.doi.org/10.1128/aem.61.12.4147-4151.1995

214. Rittmann D., Sorger-Herrmann U., Wendisch V.F. (2005). Phosphate starvation-inducible gene *ushA* encodes a 5′ nucleotidase required for growth of *Corynebacterium glutamicum* on media with nucleotides as the phosphorus source. Appl Environ Microbiol. 71:4339–4344. https://www.doi.org/10.1128/AEM.71.8.4339-4344.2005

215. Rodionova I.A., Gao Y., Sastry A., Hefner Y., Lim H.G., Rodionov D.A. et al. (2021) Identification of a transcription factor, PunR, that regulates the purine and purine nucleoside transporter *punC* in *E. coli*. Commun Biol. 4(1):991. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02516-0

216. Rodionov D.A., Hebbeln P., Eudes A., ter Beek J., Rodionova I.A., Erkens G.B. et al. (2009). A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. J Bacteriol. 191(1):42-51. https://www.doi.org/10.1128/JB.01208-08

217. Roessler B.J., Nosal J.M., Smith P.R., Heidler S.A., Palella T.D., Switzer R.L. et al.. (1993). Human X-linked phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity is associated with distinct point mutations in the PRPS1 gene. J Biol Chem. 268(35):26476-81.

218. Ruiz A., Hurtado C., Meireles Ribeiro J., Sillero A., Günther Sillero M.A. (1989). Hydrolysis of bis(5'-nucleosidyl) polyphosphates by *Escherichia coli* 5'-nucleotidase. J Bacteriol. 171:6703-6709. https://www.doi.org/10.1128/jb.171.12.6703-6709.1989

219. Sakai Y., Toda K., Mitani Y., Tsuda M., Shinoda S., Tsuchiya T. (1987). Properties of the membrane-bound 5'-nucleotidase and utilization of extracellular ATP in *Vibrio parahaemolyticus*. J Gen Microbiol. 133:2751-2757. https://www.doi.org/10.1099/00221287-133-10-2751

220. Sambrook J., Russell D.W. (2001). Molecular cloning: laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

221. Sarge S., Haase I., Illarionov B., Laudert D., Hohmann H.P., Bacher A. et al. (2015). Catalysis of an essential step in vitamin B2 biosynthesis by a consortium of broad spectrum hydrolases. Chembiochem. 16:2466–2469. https://doi.org/10.1002/cbic.201500352

222. Saxild H.H., Brunstedt K., Nielsen K.I., Jarmer H., Nygaard P. (2001). Definition of the *Bacillus subtilis* PurR operator using genetic and bioinformatic tools and expansion of the PurR regulon with *glyA, guaC, pbuG, xpt-pbuX, yqhZ-folD,* and *pbuO*. J Bacteriol. 183(21):6175-83. https://www.doi.org/10.1128/JB.183.21.6175-6183.2001

223. Saxild H.H., Nygaard P. (1987). Genetic and physiological characterization of *Bacillus subtilis* mutants resistant to purine analogs. J. Bacteriol. 169:2977-2983. https://www.doi.org/10.1128/jb.169.7.2977-2983.1987

224. Saxild H.H., Nygaard P. (1991). Regulation of levels of purine biosynthetic enzymes in *Bacillus subtilis*: effects of changing purine nucleotide pools. J Gen Microbiol. 137(10):2387-94. https://www.doi.org/10.1099/00221287-137-10-2387

225. Schallmey M., Singh A., Ward O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Can J Microbiol. 50:1–17. https://www.doi.org/10.1139/w03-076

226. Schultz-Heienbrok R., Maier T., Sträter N. (2005). A large hinge bending domain rotation is necessary for the catalytic function of *Escherichia coli* 5'-nucleotidase. Biochemistry. 44:2244-52. https://www.doi.org/10.1021/bi047989c

227. Serganov A., Yuan Y.R., Pikovskaya O., Polonskaia A., Malinina L., Phan A.T. et al. (2004). Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. Chem Biol. 11(12):1729-41. https://www.doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.11.018

228. Shapira S.K., Chou J., Richaud F.V., Casadaban M.J. (1983). New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of beta-galactosidase. Gene. 25(1):71-82. https://www.doi.org/10.1016/0378-1119(83)90169-5

229. Sharma K.K., Kalawat U. (2010). Emerging infections: *Shewanella* - a series of five cases. J Lab Physicians. 2:61-65. https://www.doi.org/10.4103/0974-2727.72150

230. Shatalin K.Y., Neyfakh A.A. (2005). Efficient gene inactivation in *Bacillus anthracis*. FEMS Microbiol Lett. 245(2):315-9. https://www.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.029

231. 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. https://www.doi.org/10.1007/s10295-010-0829-z

232. Shi S., Chen T., Zhang Z., Chen X., Zhao X. (2009). Transcriptome analysis guided metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for riboflavin production. Metab Eng. 11(4-5):243-52. https://www.doi.org/10.1016/j.ymben.2009.05.002

233. Shimaoka M., Takenaka Y., Kurahashi O., Kawasaki H., Matsui H. (2007). Effect of amplification of desensitized *purF* and *prs* on inosine accumulation in *Escherichia coli*. J Biosci Bioeng. 103(3):255-61. https://www.doi.org/10.1263/jbb.103.255

234. Shiro T., Konishi S., Tamagawa Y., Maruyama T. (1965). Method of producing guanosine by fermentation. US3575809

235. Sierro N., Makita Y., de Hoon M., Nakai K. (2007). DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. Nucleic Acids Res. 36(Database issue):D93-6. https://www.doi.org/10.1093/nar/gkm910

236. Simic P., Sahm H., Eggeling L. (2001). L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol. 183(18):5317-24. https://www.doi.org/10.1128/JB.183.18.5317-5324.2001

237. Singh I. (1997). Attenuation of ischemia/reperfusion injury. Patent US20040072138 A1.

238. Sinha S.C., Krahn J., Shin B.S., Tomchick D.R., Zalkin H., Smith J.L. (2003). The purine repressor of *Bacillus subtilis*: a novel combination of domains adapted for transcription regulation. J Bacteriol. 185(14):4087-98. https://www.doi.org/10.1128/JB.185.14.4087-4098.2003

239. Sklyarova S.A., Kreneva R.A., Perumov D.A., Mironov, A.S. (2012). The characterization of internal promoters in the *Bacillus subtilis* riboflavin biosynthesis operon. Russ. J. Genet. 48(10):967–974. https://www.doi.org/10.1134/s1022795412100109

240. Smith J.L., Zaluzec E.J., Wery J-P., Niu L., Switzer RL, Zalkin H. et al. (1994). Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. Science. 264:1427-33. https://www.doi.org/10.1126/science.8197456

241. Soh K.Y., Loh J.M.S., Proft T. (2018). Orthologues of *Streptococcus pyogenes* nuclease A (SpnA) and Streptococcal 5'-nucleotidase A (S5nA) found in *Streptococcus iniae*. J Biochem. 164:165-171. https://www.doi.org/10.1093/jb/mvy039

242. Solovieva I.M., Kreneva R.A., Leak D.J., Perumov D.A. (1999). The *ribR* gene encodes a monofunctional riboflavin kinase which is involved in regulation of the *Bacillus subtilis* riboflavin operon. Microbiology (Reading). 145 (Pt 1):67-73. https://www.doi.org/10.1099/13500872-145-1-67

243. Spizizen J. (1958). Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. Proc Natl Acad Sci U S A. 44(10):1072-8. https://www.doi.org/10.1073/pnas.44.10.1072

244. Srinivasan B., Forouhar F., Shukla A., Sampangi C., Kulkarni S., Abashidze M. et al. (2014). Allosteric regulation and substrate activation in cytosolic nucleotidase II from *Legionella pneumophila*. FEBS J 281:1613-1628. https://www.doi.org/10.1111/febs.12727

245. Steinmetz M., Richter R. (1994). Easy cloning of mini-Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome. J Bacteriol. 176(6):1761-3. https://www.doi.org/10.1128/jb.176.6.1761-1763.1994

246. Stephanopoulos G. (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. Metab Eng. 1(1):1-11. https://www.doi.org/10.1006/mben.1998.0101

247. Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N. (2000). Two-component signal transduction. Annu Rev Biochem. 183-215. https://www.doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183

248. Storer A.C., Cornish-Bowden A. (1976). Kinetics of rat liver glucokinase: Co-operative interactions with glucose at physiologically significant concentrations. Biochem J. 159(1):7-14. https://www.doi.org/10.1042/bj1590007

249. Sun J., Liu Y., Lin F., Lu Z., Lu Y. (2021). CodY, ComA, DegU and Spo0A controlling lipopeptides biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* fmbJ. J Appl Microbiol. 131(3):1289-1304. https://www.doi.org/10.1111/jam.15007

250. Switzer R.L., Sogin D.C. (1973). Regulation and mechanism of phosphoribosylpyrophosphate synthetase. V. Inhibition by end products and regulation by adenosine diphosphate. J Biol Chem. 248(3):1063-73. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)44371-8

251. Switzer R.L., Zalkin H., Saxild H.H. (2002). Purine, pyrimidine, and pyridine nucleotide metabolism, p. 255–269. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. American Society for Microbiology, Washington, DC. https://doi.org/10.1128/9781555817992.ch19

252. Tabolina E.A., Rybak K.V., Khourges E.M., Voroshilova E.B., Gusyatiner M.M. Method for producing L-amino acid using bacteria belonging to the genus *Escherichia*. US Patent 2005/0239175, 2005

253. Tatusov R.L., Fedorova N.D., Jackson J.D., Jacobs A.R., Kiryutin B., Koonin E.V. et al. (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes. BMC Bioinformatics. 4:41. https://www.doi.org/10.1186/1471-2105-4-41

254. Tatusov R.L., Koonin E.V., Lipman D.J. (1997). A genomic perspective on protein families. Science. 278(5338):631–7. https://www.doi.org/10.1126/science.278.5338.631

255. Terakawa A., Natsume A., Okada A., Nishihata S., Kuse J., Tanaka K. et al. (2016). *Bacillus subtilis* 5'-nucleotidases with various functions and substrate specificities. BMC Microbiol. 16:249. https://www.doi.org/10.1186/s12866-016-0866-5

256. Teshiba S., Furuya A. (1984). Mechanisms of 5'-Inosinic Acid Accumulation by Permeability Mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*. IV. Excretion Mechanisms of 5′-IMP. Agricultural and Biological Chemistry. 48(5):1311-17. https://www.doi.org/10.1080/00021369.1984.10866311

257. Thaller M.C., Berlutti F., Schippa S., Lombardi G., Rossolini G.M. (1994). Characterization and sequence of PhoC, the principal phosphate-irrepressible acid phosphatase of *Morganella morganii*. Microbiology (Reading). 140:1341-50. https://www.doi.org/10.1099/00221287-140-6-1341

258. Thaller M.C., Lombardi G., Berlutti F., Schippa S., Rossolini G.M. (1995). Cloning and characterization of the NapA acid phosphatase/phosphotransferase of *Morganella morganii*: identification of a new family of bacterial acid-phosphatase-encoding genes. Microbiology (Reading). 141:147-54. https://www.doi.org/10.1099/00221287-141-1-147

259. Thaller M.C., Schippa S., Bonci A., Cresti S., Rossolini G.M. (1997). Identification of the gene (*aphA*) encoding the class B acid phosphatase/phosphotransferase of *Escherichia coli* MG1655 and characterization of its product. FEMS Microbiol Lett. 146:191-198. https://www.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10192.x

260. Thammavongsa V., Kern J.W., Missiakas D.M., Schneewind O. (2009). *Staphylococcus aureus* synthesizes adenosine to escape host immune responses. J Exp Med. 206:2417–2427. https://www.doi.org/10.1084/jem.20090097

261. Thammavongsa V., Missiakas D.M., Schneewind O. (2013). *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. Science. 342:863–866. https://www.doi.org/10.1126/science.1242255

262. Thammavongsa V., Schneewind O., Missiakas D.M. (2011). Enzymatic properties of *Staphylococcus aureus* adenosine synthase (AdsA). BMC Biochem. 12:56. https://www.doi.org/10.1186/1471-2091-12-56

263. Titz B., Häuser R., Engelbrecher A., Uetz P. (2007). The *Escherichia coli* protein YjjG is a house-cleaning nucleotidase *in vivo*. FEMS Microbiol Lett. 270:49-57. https://www.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00646.x

264. Tong M., French S., El Zahed S.S., Ong W.K., Karp P.D., Brown E.D. (2020). Gene dispensability in *Escherichia coli* grown in thirty different carbon environments. mBio. 11(5):e02259-20. https://doi.org/10.1128/mBio.02259-20

265. Tremblay L.W., Dunaway-Mariano D., Allen K.N. (2006). Structure and activity analyses of *Escherichia coli* K-12 NagD provide insight into the evolution of biochemical function in the haloalkanoic acid dehalogenase superfamily. Biochemistry. 45:1183-1193. https://www.doi.org/10.1021/bi051842j

266. Trötschel C., Deutenberg D., Bathe B., Burkovski A., Krämer R. (2005). Characterization of methionine export in *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol. 187(11):3786-94. https://www.doi.org/10.1128/JB.187.11.3786-3794.2005

267. Tsuda K. (2005). Inosine, calcium channels, and neuroprotection against ischemic brain injury. Stroke. 36(9):1823; author reply 1823. https://www.doi.org/10.1161/01.str.0000176498.49686.86

268. Uerkvitz W., Beck C.F. (1981). Periplasmic phosphatases in *Salmonella typhimurium* LT2. A biochemical, physiological, and partial genetic analysis of three nucleoside monophosphate dephosphorylating enzymes. J Biol Chem. 256:382-389. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)70147-1

269. Ullman A., Danchin A. (1980). Role of cyclic AMP in regulatory mechanisms in bacteria. Trends in Biochem Sci. 5(4):95-96. https://www.doi.org/10.1016/0968-0004(80)90257-1

270. Vagner V., Dervyn E., Ehrlich S.D. (1998). A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. Microbiology (Reading). 144 (Pt 11):3097-3104. https://www.doi.org/10.1099/00221287-144-11-3097

271. Valentin-Hansen P., Hammer K., Løve Larsen J.E., Svendsen I. (1984). The internal regulated promoter of the *deo* operon of *Escherichia coli* K-12. Nucleic Acids Res. 12(13):5211-24. https://www.doi.org/10.1093/nar/12.13.5211

272. Vehmaanperä J. (1988). Transformation of *Bacillus amyloliquefaciens* protoplasts with plasmid DNA. FEMS Microbiol Lett. 49(1):101–105. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02689.x

273. Vehmaanperä J. (1989). Transformation of *Bacillus amyloliquefaciens* by electroporation. FEMS Microbiol Lett. 52(1-2):165-9. https://www.doi.org/10.1016/0378-1097(89)90190-0

274. Vehmaanperä J., Steinborn G., Hofemeister J. (1991). Genetic manipulation of *Bacillus amyloliquefaciens*. J Biotechnol. 19(2-3):221-40. https://www.doi.org/10.1016/0168-1656(91)90061-y

275. Veith B., Herzberg C., Steckel S., Feesche J., Maurer K.H., Ehrenreich P. et al. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. J Mol Microbiol Biotechnol. 7(4):204-11. https://www.doi.org/10.1159/000079829

276. Vieira J., Messing J. (1991). New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. Gene. 100:189-94. https://www.doi.org/10.1016/0378-1119(91)90365-i

277. Vogl C., Grill S., Schilling O., Stülke J., Mack M., Stolz J. (2007). Characterization of riboflavin (vitamin B2) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol. 189(20):7367-75. https://www.doi.org/10.1128/JB.00590-07

278. Vrljic M., Sahm H., Eggeling L. (1996). A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. Mol Microbiol. 22(5):815-26. https://www.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.01527.x

279. Wang L., Zhou Y.J., Ji D., Lin X., Liu Y., Zhang Y. et al. (2014). Identification of UshA as a major enzyme for NAD degradation in *Escherichia coli*. Enzyme Microb Technol. 58-59:75-79. https://www.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.03.003

280. Wang Y., Weng J., Waseem R., Yin X., Zhang R., Shen Q. (2012). *Bacillus subtilis* genome editing using ssDNA with short homology regions. Nucleic Acids Res. 40(12):e91. https://www.doi.org/10.1093/nar/gks248

281. Waschkau B., Waldeck J., Wieland S., Eichstädt R., Meinhardt F. (2008). Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants. Appl Microbiol Biotechnol. 78(1):181-8. https://www.doi.org/10.1007/s00253-007-1278-0

282. Weng M., Nagy P.L., Zalkin H. (1995). Identification of the *Bacillus subtilis* pur operon repressor. Proc Natl Acad Sci USA. 92(16):7455-9. https://www.doi.org/10.1073/pnas.92.16.7455

283. Weng M., Zalkin H. (2000). Mutations in the *Bacillus subtilis* purine repressor that perturb PRPP effector function *in vitro* and *in vivo*. Curr Microbiol. 41(1):56-9. https://www.doi.org/10.1007/s002840010091

284. Winder W.W. (2000). Method of treatment of obesity and paralyzed muscle and ergogenic aids. US20030212034 A1

285. Winkler W., Nahvy A., Breaker R.R. (2002б). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. Nature. 419(6910):952-6. https://www.doi.org/10.1038/nature01145

286. Winkler W.C., Cohen-Chalamish S., Breaker R.R. (2002a). An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(25):15908-13. https://www.doi.org/10.1073/pnas.212628899

287. Wu G., Drufva E., Wu K. (2019). Fast genome editing in *Bacillus subtilis*. Eng Life Sci. 19(6):471-477. https://www.doi.org/10.1002/elsc.201800164

288. Xie Z., Okinaga T., Qi F., Zhang Z., Merritt J. (2011). Cloning-independent and counterselectable markerless mutagenesis system in *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol. 77(22):8025-33. https://www.doi.org/10.1128/AEM.06362-11

289. Xin Q., Chen Y., Chen Q., Wang B., Pan L. (2022). Development and application of a fast and efficient CRISPR-based genetic toolkit in *Bacillus amyloliquefaciens* LB1ba02. Microb Cell Fact. 21(1):99. https://www.doi.org/10.1186/s12934-022-01832-2

290. Xue G.-P., Johnson J.S., Dalrymple B.P. (1999). High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the Grampositive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. J Microbiol. Methods. 34:183–191. https://www.doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00087-6

291. Yan X., Yu H.J., Hong Q., Li, S.P. (2008). Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol. 74(17):5556-62. 18. https://www.doi.org/10.1128/AEM.01156-08

292. Yang T., Shi Y., Yang Q., Xin Y., Gu Z., Zhang L. (2021). A Novel Regulator Participating in Nitrogen Removal Process of *Bacillus subtilis* JD-014. Int J Mol Sci. 22(12):6543. https://www.doi.org/10.3390/ijms22126543

293. Yomantas Y.A., Abalakina E.G., Golubeva L.I., Gorbacheva L.Y., Mashko S.V. (2011). Overproduction of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular glutamyl-endopeptidase as a result of ectopic multi-copy insertion of an efficiently-expressed *mpr* gene into the *Bacillus subtilis* chromosome. Microb Cell Fact. 10:64. https://www.doi.org/10.1186/1475-2859-10-64

294. Yoshida K.I., Ishio I., Nagakawa E., Yamamoto Y., Yamamoto M., Fujita Y. (2000). Systematic study of gene expression and transcription organization in the *gntZ-ywaA* region of the *Bacillus subtilis* genome. Microbiology (Reading). 146 (Pt 3):573-579. https://www.doi.org/10.1099/00221287-146-3-573

295. Youngman P.J., Perkins J.B., Losick R. (1983). Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917. Proc Natl Acad Sci U S A. 80(8):2305-9. https://www.doi.org/10.1073/pnas.80.8.2305

296. Yu S., Price M.A., Wang Y., Liu Y., Guo Y., Ni X. et al. (2020). CRISPR-dCas9 Mediated Cytosine Deaminase Base Editing in *Bacillus subtilis*. ACS Synth Biol. 9(7):1781-1789. https://www.doi.org/10.1021/acssynbio.0c00151

297. Zakataeva N.P., Aleshin V.V., Tokmakova I.L., Troshin P.V., Livshits V.A. (1999). The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. FEBS Lett. 452(3):228-32. https://www.doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00625-0

298. Zalkin H. (1993) *De novo* purine nucleotide synthesis, p. 335-341. In Sonenshein A.L., J.A. Hoch J.A., Losick R. (1993). *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

299. Zhang G., Deng A., Xu Q., Liang Y., Chen N., Wen T. (2011a). Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* TA208, a strain for industrial production of guanosine and ribavirin. J Bacteriol. 193(12):3142-3. https://www.doi.org/10.1128/JB.00440-11

300. Zhang G.Q., Bao P., Zhang Y., Deng A.H., Chen N., Wen T.Y. (2011б). Enhancing electro-transformation competency of recalcitrant *Bacillus amyloliquefaciens* by combining cell-wall weakening and cell-membrane fluidity disturbing. Anal Biochem. 409(1):130-137. https://www.doi.org/10.1016/j.ab.2010.10.013

301. Zhang K., Duan X., Wu J. (2016). Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system. Sci Rep. 6:27943. https://www.doi.org/10.1038/srep27943

302. Zhang R.G., Skarina T., Katz J.E., Beasley S., Khachatryan A., Vyas S. et al. (2001). Structure of *Thermotoga maritima* stationary phase survival protein SurE: a novel acid phosphatase. Structure. 9:1095-1106. https://www.doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00675-x

303. Zhang X.Z., Yan X., Cui Z.L., Hong Q., Li S.P. (2006). *mazF*, a novel counter-selectable marker for unmarked chromosomal manipulation in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. 34(9):e71. https://www.doi.org/10.1093/nar/gkl358

304. Zhang X.Z., Zhang P.Y.-H. (2011в). Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*. Microb Biotechnol. 4(1):98-105. https://www.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00230.x

305. Zhang Y., Morar M., Ealick S.E. (2008). Structural biology of the purine biosynthetic pathway. Cell Mol Life Sci. 65(23):3699-724. https://www.doi.org/10.1007/s00018-008-8295-8

306. Zhao X., Xu J., Tan M., Yu Z., Yang S., Zheng H., et al. (2018). Construction of a plasmid interspecific transfer system in *Bacillus species* with the counter-selectable marker *mazF*. J Ind Microbiol Biotechnol. 45(6):417-428. https://www.doi.org/10.1007/s10295-018-2038-0

307. Zhao X., Zheng H., Zhen J., Shu W., Yang S., Xu J. et al. (2020). Multiplex genetic engineering improves endogenous expression of mesophilic α-amylase gene in a wild strain *Bacillus amyloliquefaciens* 205. Int J Biol Macromol. 165(Pt A):609-618. https://www.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.210

308. Zheng L., Khemlani A., Lorenz N., Loh J.M., Langley R.J., Proft T. (2015). Streptococcal 5'-nucleotidase A (S5nA), a novel *Streptococcus pyogenes* virulence factor that facilitates immune evasion. J Biol Chem. 290:31126-31137. https://www.doi.org/10.1074/jbc.M115.677443

309. Zhou C., Shi L., Ye B., Feng H., Zhang J., Zhang R. et al. (2017). *pheS**, an effective host-genotype-independent counter-selectable marker for marker-free chromosome deletion in *Bacillus amyloliquefaciens*. Appl Microbiol Biotechnol. 101(1):217-227. https://www.doi.org/10.1007/s00253-016-7906-9

310. Zimmerman M.D., Proudfoot M., Yakunin A., Minor W. (2008). Structural insight into the mechanism of substrate specificity and catalytic activity of an HD-domain phosphohydrolase: the 5'-deoxyribonucleotidase YfbR from *Escherichia coli*. J Mol Biol. 378:215-226. https://www.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.02.036

311. Zimmermann H. (1992). 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. Biochem J. 285:345-65. https://www.doi.org/10.1042/bj2850345

312. Zoref E., De Vries A., Sperling O. (1975). Mutant feedback-resistant phosphoribosylpyrophosphate synthetase associated with purine overproduction and gout. Phosphoribosylpyrophosphate and purine metabolism in cultured fibroblasts. J Clin Invest. 56(5):1093-9. https://www.doi.org/10.1172/JCI108183

8. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. **Zakataeva N.P**. (2021). Microbial 5'-nucleotidases: their characteristics, roles incellular metabolism, and possible practical applications. Appl Microbiol Biotechnol. 105(20):7661-81. https://www.doi.org/10.1007/s00253-021-11547-w
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. https://www.doi.org/10.1007/s00253-020-10428-y
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. https://www.doi.org/10.1016/j.mimet.2018.03.011
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. https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0167580
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. https://www.doi.org/10.1007/s00253-011-3687-3
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. https://www.doi.org/10.1007/s10295-010-0829-z
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. https://www.doi.org/10.1007/s00253-010-2646-8

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. https://www.doi.org/10.1007/s00253-009-2276-1
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. https://www.doi.org/10.1016/j.resmic.2007.08.003
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. **eLIBRARY**: 17324489
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. https://www.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.051
13. Kutukova E.A., Livshits V.A., Altman I.P., Ptitsyn L.R., Zyiatdinov 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. https://www.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.031

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., Stoynova N., Baboshin M., Golubeva L., Kovaleva E., Shupletsov M. (2020). Method for producing target substance by bacterial fermentation. WO2020071538.
3. Юсупова Ю.Р., **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 *yueE*. Патентная заявка Тайланда TH150859.
4. **Закатаева Н.П.**, Юсупова Ю.Р., Скрипникова В.С., Сошникова О.Н., Романенков Д.В., Шеремет 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 фосфорибозилпирофосфатсинтетаза, 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 XMP 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 metabolies 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, Arch Clin Microbiol 2018 v 9, https://www.doi.org/10.4172/1989-8436-C2-008
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.

9. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

(d)NMP/(d)NDP/(d)NTP – рибонуклеозид или (дезокси)рибонуклеозид моно-, ди- и трифосфаты

A – аденин

ADP – аденозин-5'-дифосфат

AICA – 4-амино-5-имидазолкарбоксамид

AICAr – 5-амино-4-имидазолкарбоксамид 2'-рибонуклеозид

AICAR – 5'-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоксамид

AIR – 5'-фосфорибозил-5-аминоимидазол

AMP – аденозин-5'-монофосфат

Ap, Ap^R – ампициллин, маркер устойчивости к ампициллину

AR – аденозин

4CP – 4-хлор-DL-фенилаланин

ArP– 5-амино-6-рибитиламино-2,4-(1H, 3H) -пиримидиндион

ARPP – 5-амино-6-(рибозиламино)-2,4-(1H, 3H)-пиримидиндион-5'-фосфат

ArPP – 5-амино-6-рибитиламино-2,4-(1H, 3H)-пиримидиндион-5'-фосфат

ATP – аденозин-5'-трифосфат

Bicarbonate – H_2CO_3

CAIR – 5'-фосфорибозил-4-карбокси-5-аминоимидазол

Carbamoyl phosphate – карбамоилфосфат

Carbamoyl-Asp – карбамоиласпартат

CCCP – карбонилцианид *м*-хлорфенилгидразон

Cm, Cm^R, Cm^S – хлорамфеникол, маркер устойчивости к хлорамфениколу, чувствительность к хлорамфениколу

CMP, CDP, CTP – цитидин 5'-моно-, ди- и трифосфаты

dAMP – 2'-дезоксиаденозин-5'-монофосфат

dAR – 2'-дезоксиаденозин

DARPP – 2,5-диамино-6-рибозиламино-4 (3H) -пиримидиндион фосфат

dATP – 2'-дезоксиаденозин-5'-трифосфат

ddH_2O – бидистиллированная вода

dGMP – 2'-дезоксигуанозин-5'-монофосфат

dGR – 2'-дезоксигуанозин

dGTP – 2'-дезоксигуанозин -5'-трифосфат

DHBP – 3,4-дигидрокси-2-бутанон 4-фосфат

dHxR – 2'-дезоксиинозин

dNTP – смесь 2'-дезоксирибонуклеотидов

DRL – 6,7-диметил-8-рибитил-люмазин

DSB – двуцепочечный разрыв

Em, Em^R, Em^S – эритромицин, маркер устойчивости к эритромицину, чувствительность к эритромицину

FAD – флавинадениндинуклеотид

FAD – флафинадениндинуклеотид

FAICAR – 5'-фосфорибозил-5-формил-4-аминоимидазолкарбоксамид

FGAM – 5'-фосфорибозил-N-формилглицинамидин

FGAR – 5'-фосфорибозил-N-формилглицинамид

FMN – флавинмононуклеотид

fTHF – 10-формилтетрагидрофолат

G – гуанин

G1P – глюкозо-1-фосфат

G6P – глюкозо-6-фосфат

GAR – 5-фосфорибозилглицинамид

GDP – гуанозин-5'-дифосфат

GDP – гуанозин-5'-дифосфат

GMP – гуанозин-5'-монофосфат

GR – гуанозин

gRNA – «РНК-гид»

GTP – гуанозин-5'-трифосфат

HDR – гомологически направленная репарация ДНК

Hx – гипоксантин

HxR – инозин

IMAC (immobilized-metal affinity chromatography) – металл-аффинная хроматография

IMP – инозин-5'-монофосфат

IPTG – β-D-1-тиогалактопиранозид

Km, Km^R – канамицин, маркер устойчивости к канамицину

LC-MS/MS – жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия

MFS – суперсемейство белков, Major Facilitator Superfamily

MW – молекулярная масса

NAD^+ – β-никотинамидадениндинуклеотид

$NADP^+$ – β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат

NCAIR – 5'-фосфорибозил-5-карбоксиаминоимидазол

NMN – никотинамидмононуклеотид

OD, ОП– optical density, оптическая плотность

Orotate – оротат

Orotidine 5'-phosphate – оротидин-5'- фосфат

PAM – (Protospacer Adjacent Motif), последовательность ДНК из 2-6 пар оснований,

PDE – фосфодиэстеразная активность

Pi – неорганический фосфат

PLP – пиридоксаль-5'-фосфат

*p*NPP – пара-нитрофенилфосфат

PP_i – неорганический пирофосфат

PRA – 5-фосфорибозиламин

PRPP – 5-фосфорибозил-1-пирофосфат

R5P – рибозо-5-фосфат

RF – рибофлавин

RFN –riboswitch FMN-specific element

Ru5P – рибулозо-5-фосфат

SAICAR – 5'-фосфорибозил-4-(N-сукцинокарбоксамид)-5-аминоимидазол

SAMP – сукциниладенозин-5'-монофосфат

SDS – додецилсульфат натрия

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis) – электрофорез в полиакриламидном геле

Sm, Sm^R – стрептомицин, маркер устойчивости к стрептомицину

Tc, Tc^R – тетрациклин, маркер устойчивости к тетрациклину

TMS – трансмембранный сегмент

UDP – уридиндифосфат

UMP, UDP, UTP – уридин 5'-моно-, ди- и трифосфаты

UPLC – сверхпроизводительная жидкостная хроматография

X – ксантин

XMP – ксантозин-5'-монофосфат

XR – ксантозин

Выход продукта – это отношение полученной массы продукта к массе затраченного источника углерода (глюкозы) (в %)

ВЭЖХ или HPLC– высокоэффективная жидкостная хроматография

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КоА – кофермент А

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ОРС – открытая рамка считывания

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

Ферментация – процесс, в котором происходит преобразование исходного сырья в продукт с использованием биохимической деятельности микроорганизмов или изолированных клеток

10.БЛАГОДАРНОСТИ

Хочу искренне поблагодарить всех моих коллег из АО «АГРИ», с которыми я имела счастье работать на разных этапах выполнения данной работы, и как руководитель, и как подчиненная, 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 нашем институте. Спасибо моим соавторам Лившицу В.А., Гронскому С.В., Скрипниковой В.С., Юсуповой Ю.Р., Романенкову Д.В., Алешину В.В., Харченко М.С., Шакулову Р.С., Шеремет А.С., Никитиной О.В., Кутуковой Е.А., Трошину П.В., Токмаковой И.Л., Киверо А.Д., Асахаре Т. и другим.

Особые слова признательности хочу выразить моим учителям – Лившицу Виталию Аркадьевичу и Алешину Владимиру Вениаминовичу, которых благодарю не только за переданный ими профессиональный опыт, но и бесценные уроки любви к познанию природы явлений и творческого оптимизма.

Спасибо моим родным и близким, особенно моему мужу Ильдару, за поддержку, понимание и одобрение необходимости писать этот труд в выходные дни. С огромной благодарностью я хочу посвятить эту работу моей любимой старшей сестре Леночке, которая всегда поддерживала, вдохновляла и направляла меня на этом пути подготовки, написания и защиты докторской диссертации, как и во всех других моих делах и жизненных перепетиях, и которой уже нет и никогда не будет рядом…