

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу **ЮСУПОВОЙ Юлии Рашитовны**

«Поиск, изучение и практическое применение генов 5'-нуклеотидаз

промышленно-значимых видов бацилл»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.7 – генетика

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Юсуповой Ю. Р. посвящена поиску и изучению генов 5'-нуклеотидаз промышленно-значимых бацилл (род *Bacillus*) с целью расширить знания о взаимопревращении пуриновых соединений и найти новые подходы к улучшению свойств таких штаммов.

Грамположительные бактерии *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* давно используются в промышленности и в научных исследованиях. Поскольку геномы, транскриптомы и клеточный метаболизм данных микроорганизмов достаточно хорошо изучен, их активно используют в биотехнологии для получения различных ферментов, витаминов и целого ряда важных метаболитов, таких как рибофлавин, инозин, гуанозин и акадезин (AICAR). Биосинтез этих соединений происходит с участием реакций нуклеотидного метаболизма, и в частности, 5'-нуклеотидаз. 5'-нуклеотидазы – это ферменты, которые осуществляют дефосфорилирование нуклеотидов и их производных до соответствующих нуклеозидов и неорганического фосфата и, таким образом, вовлечены в *salvage*, а также *de novo* пути биосинтеза нуклеотидов. Несмотря на важную роль 5'-нуклеотидаз в клетке, и сами ферменты, и генетический контроль их синтеза мало изучены у бактерий рода *Bacillus*.

Таким образом, поиск и изучение генов, кодирующих 5'-нуклеотидазы у штаммов *Bacillus*, имеет фундаментальное значение, так как расширяет представление о ферментах превращения нуклеотидов и регуляции клеточного метаболизма, а также имеет прикладное значение в области создания продуцентов для биотехнологических производств.

Структура диссертации

Диссертационная работа Юсуповой Ю. Р. имеет традиционную структуру, характерную для подобных работ, и содержит главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Общие выводы», «Список сокращений» и «Список цитированной литературы» (183 источника). Работа изложена на 131 странице, включая 53 рисунка и 16 таблиц.

В главе «Введение» отмечена актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования, разъяснены научная новизна и практическая значимость работы.

Глава «Обзор литературы» содержит три части. В первой части коротко рассказано о промышленно значимых штаммах *Bacillus*, их свойствах, и применении в науке и промышленности. Во второй части рассмотрены пути биосинтеза пуринов и рибофлавина в частности; отмечена роль нуклеотидаз в этих процессах. В третьей части изложена общая информация о 5'-нуклеотидазах, рассказана их биологическая роль в клетке, механизмы ферментного катализа, а также более подробно рассмотрены представители суперсемейств НАД (галоген кислотные дегидрогеназы), HD семейство и семейство кальцийнериновых металлофосфатаз. Отдельным пунктом отмечены охарактеризованные на сегодняшний день 5'-нуклеотидазы у *B. subtilis*.

Глава «Материалы и методы» содержит информацию об используемых в исследовании молекулярно-генетических, биохимических, аналитических и компьютерных методах.

В главе «Результаты и обсуждение», которая состоит из 3-х частей, приведены и проанализированы результаты проведенных экспериментов. В первой части представлены данные по исследованию гена *B. subtilis yutF*, кодирующего одноименную 5'-нуклеотидазу YutF. Описан способ обнаружения данной нуклеотидазы, ее биохимические характеристики; показана специфичность и кинетические параметры рекомбинантного белка Ht-YutF, проведено исследование оперона *yutDEF*, а также обсуждается функция данного белка в клетке. Во второй и третьей части исследованы гены *yitU* и *yueE* из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, соответственно, найденные в ходе селективного отбора по устойчивости к пуриновым нуклеозидам. Для рекомбинантного белка Ht-YitU были показаны биохимические характеристики, исследована специфичность и кинетические параметры. На основании полученных в работе данных, а также данных из литературных источников была выявлена предположительная биологическая роль YitU в клетке. С помощью экспериментов *in vivo* было исследовано влияние делеции и сверхэкспрессии гена *yitU* на внеклеточное накопление рибофлавина (в штаммах дикого типа и продуцирующих это соединение) и AICAR (в соответствующих штаммах-продуцентах). В третьей части определены начальные биохимические характеристики рекомбинантного Ht-YueE.

В главе «Выводы» суммированы результаты исследования.

Степень достоверности результатов и обоснованности выводов, сделанных автором, а также научная новизна и практическая значимость исследования

В настоящей работе были идентифицированы три гена, кодирующие ферменты, задействованные в нуклеотидном метаболизме у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, *yutF*, *yitU* и *yueE*. Для поиска генов были использованы 2 разных подхода.

Первый подход основан на поиске в базах данных *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* белков гомологичных ранее охарактеризованной 5'-нуклеотидазе UmpH из *E. coli*. С помощью этого подхода было обнаружено, что предполагаемая гидролаза суперсемейства НАД, кодируемая геном *yutF*, является наиболее вероятным ортологом UmpH у *B. subtilis*. Ген *yutF* *B. subtilis* был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli*. Для белка YutF впервые были определены биохимические характеристики: оптимум pH, активация ионами металлов, субстратная специфичность и кинетические параметры. Показано, что он обладает фосфогидролазной активностью в отношении множества физиологических субстратов, включая различные 5'-нуклеотиды и их метаболические предшественники. Наиболее предпочтительными природными субстратами для рекомбинантного YutF являлись ксантозин-5'-монофосфат, 5-фосфорибозил-1-пирофосфат и рибозо-5-фосфат. В настоящей работе экспериментально показано, что ген *yutF* входит в состав оперона *yutDEF* и впервые изучена регуляция его экспрессии.

Второй подход к поиску 5'-нуклеотидаз был впервые предложен в настоящей работе и основан на получении библиотеки генов с последующим прямым отбором фрагментов ДНК, содержащих гены 5'-нуклеотидаз по устойчивости клеток штамма *E. coli* GS72 (TG1 Δ *deoD gsk-3*) к ингибирующим концентрациям пуриновых нуклеозидов, гуанозину и инозину. С помощью этого подхода у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* были обнаружены гены *yitU* и *yueE*, продукты которых были биохимически охарактеризованы.

Продукт гена *yitU* относится к 5'-нуклеотидазам суперсемейства НАД, проявляет специфичность в отношении широкого спектра дезоксирибо- и рибонуклеозидмонофосфатов, а также участвует в биосинтезе рибофлавина из FMN. Показано, что благодаря способности дефосфорилировать важный редокс-активный кофактор FMN и аналог АМР со множеством регуляторных функций, AICAR-P, YitU участвует в регуляции клеточного метаболизма. Также впервые было продемонстрировано, что сверхэкспрессия *yitU* может быть успешно применена для улучшения свойств штаммов, продуцирующих рибофлавин и AICAR.

Ген *B. subtilis* *yueE* впервые был клонирован, экспрессирован в клетках *E. coli* и для него была показана фосфодиэстеразная активность в отношении циклических нуклеотидов.

Результаты диссертационной работы углубляют знания о ферментах превращения нуклеотидов, регуляции экспрессии кодирующих их генов, а значит и регуляции клеточного метаболизма в целом. Кроме того, полученные результаты имеют важное

практическое значение и могут быть использованы для создания новых и улучшения имеющихся штаммов-продуцентов рибофлавина и AICAR.

Опубликование результатов диссертации

Результаты и выводы диссертационной работы Юсуповой Ю. Р. представлены в 7 научных публикациях: в 3 статьях в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК, в 1-ой патентной заявке и в 3-х тезисах международных научных конференций.

Замечания к работе

1. Штамм *B. subtilis* Y25 способен накапливать рибофлавин из-за повышенной экспрессии генов пуринового синтеза, сверхэкспрессии генов рибофлавинового оперона, а также за счёт сниженной активности рибофлавин киназы, кодируемой геном *ribC1*. Автор объясняет положительный эффект сверхэкспрессии *yitU* в штамме Y25 на накопление рибофлавина несколькими факторами: 1) активацией одного из этапов биосинтеза флавинов *de novo* (а именно, дефосфорилирование ARPP), 2) повышенной конверсией FMN в рибофлавин, что приводит к снижению внутриклеточного пула FMN и 3) усилением экспрессии генов биосинтеза рибофлавина в результате снятия негативной регуляции FMN. Однако, в штамме Y25 со сниженной активностью рибофлавин киназы внутриклеточный пул FMN сам по себе низкий, а *rib*-оперон дерегулирован. Поэтому нельзя однозначно утверждать, что положительный эффект сверхэкспрессии *yitU* в штамме Y25 связан с факторами 2 и 3.
2. Интересно было бы количественно сравнить уровень синтеза рибофлавина штаммами BsC⁺ (pMWAL1-PyitU_{Ba}-yitU_{Bs}) и BsΔyutF (pMWAL1-PyitU_{Ba}-yitU_{Bs}). Визуально среда культивирования штамма BsΔyutF (pMWAL1-PyitU_{Ba}-yitU_{Bs}) окрашена более интенсивно (рис. 40), однако автор не объясняет, с чем связан более высокий уровень синтеза рибофлавина.
3. Можно ли утверждать, что найдена недостающая фосфатаза в пути синтеза рибофлавина (реакция ARPP→ARtU)?
4. Удельные активности фермента Ht-YutF, представленные в табл. 6, измеряли с 5 mM субстратами. Однако, для R5P кинетическая константа K_m = 24 mM. Поэтому в табл. 7 для наглядности не хватает значений V_{max}, как это сделано в табл. 12 для фермента Ht-YitU_{Bs}

5. В разделе «Материалы и методы» отсутствует общий список солей, использованных для исследования активации ферментов ионами металлов, что несколько затрудняет восприятие результатов.

Также в тексте присутствует небольшое количество опечаток.

Заключение.

Диссертация Юсуповой Ю. Р. является завершённой работой, выполненной на хорошем методическом уровне с использованием всех необходимых современных молекулярно-генетических методов; ее содержание полностью соответствует всем требованиям, представленным в «Положении о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 N 842.

Достоверность результатов, полученных автором в рамках проведенных исследований, не вызывает сомнений. Выводы, сделанные автором, адекватны поставленным целям и полученным результатам.

Автор диссертационной работы заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Берзина Оксана Валентиновна

кандидат биологических наук,

ведущий научный сотрудник,

Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Курчатовский комплекс генетических исследований (ГосНИИгенетика)

Адрес института: 123182, г. Москва, пл. Ак. Курчатова д.1

Тел.: +7(499) 196-95-39

www.nrcki.ru

Подпись Берзиной О. В. удостоверяю:

Заместитель директора
по международному
сотрудничеству и
кадрам



подпись
29.04.2022

Сороко Андрей
Викторович