



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*  
Российской академии наук  
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика  
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru), [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)  
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001



«Утверждаю»

Директор ИБХ РАН  
академик

А.Г. Габиров  
21.04.2022 г.

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

на диссертационную работу соискателя

**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**

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

**Актуальность темы исследования**

Грамположительные бактерии *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* давно используются как в промышленности, так и в научных исследованиях метаболизма грамположительных бактерий в качестве модельных объектов. Штаммы данных микроорганизмов хорошо растут на синтетических средах, имеют статус безопасных организмов GRAS, а их геномы, транскриптомы и клеточный метаболизм достаточно хорошо изучены. Поэтому они активно используются в биотехнологии для получения рекомбинантных белков, антимикробных соединений, адсорбентов, поверхностно-активных веществ, а также D-рибозы, витаминов, пуриновых нуклеозидов, полигаммаглутаминовых кислот и целого ряда других химических

веществ. Биосинтез рибофлавина и пуриновых нуклеозидов инозина, гуанозина и акадезина (AICAR) происходит с участием 5'-нуклеотидаз. 5'-Нуклеотидазы – это ферменты, которые осуществляют дефосфорилирование нуклеотидов и их производных до соответствующих нуклеозидов и неорганического фосфата и, таким образом, вовлечены в резервный (*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 и содержание работы**

Диссертационная работа построена по общепринятому плану и содержит следующие главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Общие выводы», «Список сокращений» и «Список цитированной литературы».

В главе «Введение» сформулированы актуальность, цели и задачи работы, обозначены научная новизна и практическая значимость. Глава «Обзор литературы» содержит три части. В первой части кратко освещены свойства и применение промышленно значимых штаммов *Bacillus* в науке и промышленности. Во второй части рассмотрены пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов и рибофлавина; отмечена роль 5'-нуклеотидаз в этих процессах. В третьей части изложена общая характеристика 5'-нуклеотидаз, механизмы ферментного катализа, а также более подробно рассмотрены представители суперсемейства НАД (галоген кислотные дегидрогеназы), HD семейства и семейства кальцийнериновых металлофосфатаз. Отдельно отмечены охарактеризованные на сегодняшний день 5'-нуклеотидазы у *B. subtilis* и обоснована актуальность задачи дальнейших исследований этих ферментов. 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 исследований. В первой части представлены данные по идентификации и исследованию гена *B. subtilis yutF*, кодирующего 5'-нуклеотидазу YutF, изложен материал по изучению регуляции гена в составе оперона *yutDEF*. Подробно описаны биохимические характеристики продукта гена, рекомбинантного белка Ht-YutF, его субстратная специфичность и кинетические параметры, а также обсуждается функция данного белка в клетке. Во второй и третьей части главы изложен оригинальный подход для

поиска генов 5'-нуклеотидаз путем прямого селективного отбора по устойчивости к пуриновым нуклеозидам. Обнаруженные в результате поиска гены *yitU* и *yueE* из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, соответственно, были идентифицированы как гены, кодирующие 5'-нуклеотидазу и фосфодиэстеразу. Для рекомбинантного белка YitU были подробно изучены биохимические характеристики, исследована субстратная специфичность и кинетические параметры. На основании полученных в работе данных, а также данных из литературных источников, было сделано предположение о биологической роли YitU в клетке. С помощью экспериментов *in vivo* было исследовано влияние делеции и сверхэкспрессии гена *yitU* на внеклеточное накопление рибофлавина и AICAR. В третьей части впервые определены начальные биохимические характеристики очищенного рекомбинантного белка YueE.

В главе «Выводы» суммированы результаты исследования.

Работа изложена на 131 странице, содержит 53 рисунка, 16 таблиц и 183 источника цитированной литературы.

### **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 два 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 HAD, кодируемая геном *yutF*, является наиболее вероятным ортологом UmpH у *B. subtilis*. Ген *yutF* *B. subtilis* был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli*. Для рекомбинантного 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 являются 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 его экспрессия подвержена положительной авторегуляции.

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  $\Delta deoD$  *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 затем биохимически охарактеризованы.

Продукт гена *yitU* относится к 5'-нуклеотидазам суперсемейства НАД, проявляет специфичность в отношении широкого спектра дезоксирибо- и рибонуклеозидмонофосфатов, но имеет наибольшее сродство к рибофлавин-5'-фосфату (или флавинмононуклеотиду, FMN), участвуя таким образом в биосинтезе рибофлавина. Показано также, что благодаря способности дефосфорилировать не только важный редокс-активный кофактор FMN, но также и AICAR-P (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозил 5'-монофосфат), аналог АМР со множеством регуляторных функций, YitU моделирует пулы этих важных соединений, участвуя таким образом, в регуляции клеточного метаболизма. Впервые было продемонстрировано, что сверхэкспрессия *yitU* может быть успешно применена для улучшения свойств штаммов, продуцирующих рибофлавин или AICAR.

Продукт гена *B. subtilis yueE* был клонирован, выделен и очищен в виде рекомбинантного белка 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.

Однако, несмотря на высокий научный и методический уровень, работа не лишена определенных недостатков, например, дублирование расшифровки аббревиатур, которые есть в списке сокращений (в том числе, общепринятых – никотинамидадениндинуклеотидфосфат – стр. 5 и 13), неудачное форматирование списка литературы с очень большими пробелами, незначительные стилистические погрешности. Автор диссертации является первым автором только в одной из трех своих статей, поэтому было бы полезно указать в автореферате ее вклад в эти статьи (например, как это делается в последнее время в некоторых диссертационных советах, где указывается объем статьи и доля автора в печатных листах). Эти недостатки, впрочем, не являются существенными и не снижают общего высокого уровня диссертационной работы.

### **Заключение.**

Диссертация Юсуповой Ю. Р. является завершенной работой, выполненной 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 (ред. от 01.10.2018 г., с изм. от 26.05.2020 г.).

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

Основные 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.

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

Отзыв на диссертационную работу Юсуповой Ю. Р. «Поиск, изучение и практическое применение генов 5'-нуклеотидаз промышленно-значимых видов бацилл» рассмотрен, обсужден и утвержден на открытом семинаре Отдела биоинженерии ИБХ РАН (Протокол № 1 от 20.04.2022 г).

Заведующий лабораторией инженерии белка ИБХ РАН

доктор биологических наук, профессор

Долгих Д.А.

личную подпись: Долгих Д.А.  
**УДОСТОВЕРЯЮ**  
СПЕЦИАЛИСТ ОТДЕЛА  
КАДРОВ ИБХ РАН  
А. Б. КОРНЕЕВА  
495 330 56 83  
20.04.2022



Сведения о составителе отзыва:

Долгих Д.А., доктор биологических наук по специальности 03.01.03 «молекулярная биология», заведующий лабораторией инженерии белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Почтовый адрес: ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997

Тел: +7 (495) 335-28-88

Интернет-сайт: <https://www.ibch.ru/structure/groups/proteng>

e-mail: [dolgikh@nmr.ru](mailto:dolgikh@nmr.ru)