

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

В диссертационной работе Юсуповой Ю. Р. проведен поиск и изучение генов 5'-нуклеотидаз промышленно-значимых бацилл *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* с целью расширить знания о взаимопревращении пуриновых соединений и найти новые подходы к улучшению свойств вышеуказанных штаммов.

Грамположительные бактерии *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* активно используются как в научных исследованиях в качестве модельных штаммов, так и в промышленности в качестве продуцентов различных ферментов, а также для целого ряда важных метаболитов, например, рибофлавина, инозина, гуанозина и акадезина (AICAR). Биосинтез перечисленных 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, кодирующие их гены и свойства самих ферментов, 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. изложена на 131 страницах машинописного текста и включает стандартные для подобных работ разделы: Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Общие выводы», «Список сокращений» и «Список цитированной литературы». Диссертация содержит 53 рисунка и 16 таблиц. Библиографический указатель содержит 183 источника.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность диссертационного исследования; формулируется цель и основные задачи работы; описывается предлагаемый автором подход к решению поставленных задач; характеризуется степень новизны полученных результатов и их апробация.

Раздел «Обзор литературы» состоит из трех частей. В первой части коротко рассказано о промышленно значимых штаммах *Bacillus*, их свойствах, применении в науке и промышленности. Во второй части рассмотрены пути биосинтеза пуринов и рибофлавина; 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 HAD (галоген кислотные дегидрогеназы), HD семейства и семейства кальцийнериновых металлофосфатаз. Отдельно описаны охарактеризованные на сегодняшний день 5'-нуклеотидазы у *B. subtilis*.

Раздел «Материалы и методы» содержит достаточно подробное описание примененных автором методов, молекулярно-генетических, биохимических, а также методов биоинформатики; также перечислены бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из трех подразделов, в которых приведены и проанализированы результаты проведенных экспериментов.

В первом подразделе описан ген *B. subtilis yutF*, кодирующий одноименную 5'-нуклеотидазу YutF. Показан способ обнаружения данного гена, изучена его регуляция в составе оперона *yutDEF*, подробно исследованы биохимические характеристики продукта гена; показана специфичность и кинетические параметры рекомбинантного белка Ht-YutF, и возможная роль данного белка в метаболизме клетки.

Во втором и третьем подразделе описаны гены *yitU* и *yueE*, полученные в ходе селективного отбора устойчивых к пуриновым нуклеозидам клонов, содержащих плазмиды с различными вставками хромосом *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, соответственно. Для рекомбинантного белка Ht-YitU были показаны биохимические характеристики, исследована специфичность и кинетические параметры. На основании полученных данных, а также анализа данных литературных источников была предположена биологическая роль YitU в клетке. С помощью экспериментов *in vivo* было показано влияние делеции и сверхэкспрессии гена *yitU* в штаммах *B. subtilis* дикого типа и штамме-продуценте рибофлавина; а также в штаммах продуцентах пуриновых нуклеозидов и AICAR на основе *B. amyloliquefaciens*.

В третьем подразделе определены начальные биохимические характеристики рекомбинантного Ht-YueE.

В разделе «Выводы» кратко сформулированы основные 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 *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, *yutF*, *yitU* и *yueE*. Для поиска генов были использованы различные подходы.

Первый подход основан на поиске в базах данных *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* белков гомологичных ранее охарактеризованной 5'-нуклеотидазе UmpH из *E. coli*. 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 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 XMP (ксантозин-5'-монофосфат), PRPP (5-фосфорибозил-1-пирофосфат) и R5P (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 HAD, 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, а также клеточный алармон 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, в частности, 5'-нуклеотидаз, регуляции экспрессии кодирующих их генов, а значит и важны для понимания 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 том числе в 3 статьях в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК (Биотехнология, PLoS One и Applied Microbiology and Biotechnology).

Замечания к работе.

1. Рис 3 недостаточно описан. Остаётся неясным путь синтеза AICAR из АТР путём отсоединения гистидина. Ситуацию могла бы прояснить ссылка на работу, из которой была взята схема, но её нет под рисунком.
2. В разделе «Определение кинетических параметров» определяемые параметры сводятся к K_m и K_{cat} , однако считается, что к основным кинетическим параметрам относится так же порядок реакции.
3. Не хватает в обсуждении работы гипотезы о роли гена *uueE* в функционировании клетки и краткого филогенетического анализа гомологов этого гена.

Заключение.

Диссертация Юсуповой Ю. Р. является завершённой работой, выполненной на хорошем методическом уровне с использованием современных молекулярно-генетических методов; её 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, абсолютно соответствуют поставленным целям и полученным результатам. Приведённые замечания не снижают уровня и значимости работы Юсуповой Ю.Р.

В соответствии с вышеизложенным считаю, что автор диссертационной работы заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Манухов Илья Владимирович

доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной генетики, заместитель заведующего кафедры биофизики ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», д.б.н.

141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д. 9.

Юридический адрес: 117303, г. Москва, ул. Керченская, д. 1 «А», корп. 1.

Телефон: +7(905)562-29-24; +7(495)408-45-54

E-mail: manukhovi@mail.ru, info@phystech.edu, info@mipt.ru, сайт: www.mipt.ru

Подпись д.б.н. Манухова И. В. заверяю

Ученый секретарь МФТИ

Кандидат физико-математических наук, доцент

Е. Г. Евсеев

28.04.2022

