

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Ахмед Абдуллах Хасан Ахмед

**РОЛЬ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ЦИКЛА КРЕБСА И
ГЛИОКСИЛАТНОГО ПУТИ В АДАПТИВНОЙ РЕАКЦИИ
БАКТЕРИАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА *SPHAEROTILUS NATANS*
ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ ПИТАНИЯ**

Специальность 03.01.04 – биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель –
доктор биологических наук, профессор
Епринцев Александр Трофимович

Воронеж – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Особенности серного метаболизма у бактерий <i>Sphaerotilus natans</i>	12
1.2. Регуляторные аспекты функционирования сукцинатдегидрогеназной ферментной системы.....	16
1.3. Физико-химические характеристики и регуляция изоцитратлиазы – маркерного энзима глиоксилатного цикла.....	29
1.4. Функции аконитатгидратазы и особенности ее регуляции.....	36
1.5. Молекулярные аспекты функционирования ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла.....	43
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	51
2.1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
2.1.1. Объекты исследования.....	51
2.1.2. Состав питательных сред.....	51
2.1.3. Микроаэробное культивирование.....	52
2.1.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	53
2.1.2.1. Получение клеточной суспензии и ферментных препаратов.....	53
2.1.2.2. Методы определения активности ферментов серного метаболизма.....	53
2.1.2.3. Анализ неорганических соединений серы.....	54
2.1.2.4. Определение активности ключевых ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла	54
2.1.2.4.1. Определение активности сукцинатдегидрогеназы.....	54
2.1.2.4.2. Определение активности аконитатгидратазы.....	55
2.1.2.4.3. Определение активности изоцитратлиазы.....	55
2.1.2.5. Определение количества белка.....	56
2.1.2.6. Проведение электрофоретических исследований.....	56
2.1.2.6.1. Аналитический электрофорез.....	56

2.1.2.6.2. Специфическое проявление сукцинатдегидрогеназы, изоцитратлиазы и аконитатгидратазы.....	57
2.1.2.7. Методика получения высокоочищенных препаратов изоформ аконитатгидратазы и сукцинатдегидрогеназы.....	59
2.1.2.7.1. Очистка аконитатгидратазы.....	60
2.1.2.7.2. Разделение и очистка изоформ сукцинатдегидрогеназы.....	60
2.1.2.8. Исследование кинетических характеристик и регуляции активности изоформ ферментов.....	61
2.1.2.9. Молекулярно-биологические методы идентификации генов и исследование их экспрессии (СДГ, АГ и ИЦЛ).....	61
2.1.2.9.1. Выделение суммарной клеточной РНК.....	61
2.1.2.9.2. Определение концентрации суммарной клеточной РНК.....	62
2.1.2.9.3. Получение кДНК методом обратной транскрипции.....	62
2.1.2.9.4. Аналитический электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле.....	63
2.1.2.9.5. Подбор специфических праймеров.....	63
2.1.2.9.6. Проведение ПЦР в реальном времени.....	64
2.1.2.10. Статистическая обработка экспериментальных данных.....	64
2.3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	66
2.3.1. Трансформация серного метаболизма у штаммов <i>S. natans</i> subsp. <i>sulfidivorans</i> Д-501 и Д-507 при разных условиях культивирования	66
2.3.1.1. Влияние аэробного режима культивирования бактерий штамма Д-501 на скорость и продукты окисления тиосульфата.....	66
2.3.1.2. Анализ особенностей серного метаболизма штамма Д-507 <i>Sphaerotilus natans</i> при разных условиях питания.....	68
2.3.2. Особенности динамики активности ферментов серного метаболизма у бактерий в разных условиях культивирования.....	69

2.3.3. Активность ключевых ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла у штаммов <i>Sphaerotilus natans</i> subsp. <i>sulfidivorans</i> при разных условиях культивирования.....	72
2.3.3.1. Изменение активности ферментов ЦТК и ГЦ у штамма Д-501.....	73
2.3.3.2. Активность ключевых ферментов ЦТК и ГЦ в бактериях штамма Д-507.....	77
2.3.3.3. Активность сукцинатдегидрогеназы, изоцитратлиазы и аконитатгидратазы в бактериях штамма Д-380.....	81
2.3.4. Изоферментный состав ключевых ферментов ЦТК и ГЦ в штамме Д-501.....	83
2.3.4.1. Изоферментный состав СДГ в штамме Д-501.....	83
2.3.4.2. Изоферментный состав АГ в штамме Д-501.....	85
2.3.4.3. Изоферментный состав ИЦЛ в штамме Д-501.....	86
2.3.4.4. Изоферментный состав СДГ в бактериях штамма Д-507.....	88
2.3.4.5. Изоферментный состав аконитатгидратазы.....	90
2.3.4.6. Изоферментный состав изоцитратлиазы.....	91
2.3.4.7. Изоферментный состав сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и изоцитратлиазы у бактерий штамма Д-380.....	92
2.3.5. Разделение изоформ сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы с помощью ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Sephacel и исследование их кинетических характеристик.....	94
2.3.5.1. Использование ДЭАЭ-Sephacel для разделения изоформ сукцинатдегидрогеназы.....	95
2.3.5.2. Разделение изоформ аконитатгидратазы с помощью ионообменной хроматографии.....	98
2.3.5.3. Исследование некоторых регуляторных характеристик изоформ СДГ из бактерий штаммов Д-501 и Д-507.....	101
2.3.6. Экспрессия генов исследуемых ферментов ЦТК и ГЦ у бактерий разных штаммов <i>S.natans</i> при изменении условий культивирования.....	105

2.3.6.1. Экспрессия генов изоцитратлиазы, аконитатгидратазы и сукцинатдегидрогеназы <i>S.natans</i> , штамм Д-501 при изменении аэробного режима культивирования.....	105
2.3.6.2. Идентификация генов, кодирующих изоферменты ключевых энзимов ЦТК и ГЦ в бактериях штамма Д-507 <i>S. natans</i> при разных условиях питания.....	108
2.3.6.3. Экспрессия изучаемых генов в бактериях штамма Д-380 при хемогетеротрофном типе питания.....	110
2.3.7. Синтез полигидроксибутиратов (PHB).....	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	113
ВЫВОДЫ.....	119
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	121

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ,
СИМВОЛОВ, ТЕРМИНОВ**

- АГ – аконитатгидратаза, аконитаза
АМФ – аденозинмонофосфат
АТФ – аденозинтрифосфат
ГТФ – гуанозинтрифосфат
ГЦ – глиоксилатный цикл
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДТТ – дитиотрейтол
ДЭАЭ – диэтиламиноэтил
ИЦЛ – изоцитратлиаза
кДНК – комплементарная ДНК
НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид
ПААГ – полиакриламидный гель
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
РНК – рибонуклеиновая кислота
СФ – спектрофотометр
СДГ - сукцинатдегидрогеназа
ТЕМЕД - N,N,N',N' - тетраметилэтилен диамин
ТАК – транс-аконитовая кислота
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Из двух подвигов, входящих в состав *Sphaerotilus natans*, только один *S. natans* subsp. *sulfidivorans* способен к хемолитоорганотрофному типу питания. Способность к миксотрофному типу питания индуцируется у некоторых штаммов при микроаэробном культивировании. При этом показана их способность к хемолитоорганотрофному типу питания в присутствии восстановленных соединений серы на биохимическом уровне. Большой интерес вызывают исследования биохимического механизма трансформации основного углеродного метаболизма у этих бактерий при переходе от органогетеротрофии к хемолитогетеротрофному типу питания. Несомненно, важную роль в этой адаптивной реакции играют такие ферменты, как изоцитратлиаза (ИЦЛ, КФ 4.1.3.1) –маркерный фермент глиоксилатного цикла, аконитатгидратаза (АГ, КФ 4.2.1.3), катализирующая «аконитазное равновесие» в цикле трикарбоновых кислот и глиоксилатном пути, и сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.5.1), долгое время считавшаяся маркерным ферментом цикла Кребса. Однако, кроме обеспечения функционирования цикла трикарбоновых кислот, этот фермент участвует в утилизации янтарной кислоты, возникающей в глиоксилатном цикле, то есть его функция связана и с глюконеогенезом (Епринцев и др., 2016). Известно, что у бактерий, меняющих направление и интенсивность метаболических процессов при адаптации, редко встречается изоферментный полиморфизм (Хочачка, Сомеро и др., 1977). Ранее нами было показано, что малатдегидрогеназная ферментная система, участвующая в адаптации к смене типа питания (Епринцев, 2015), меняла свою молекулярную структуру с димерной формы (обеспечивает работу ЦТК) на тетрамерную (функционирует в глиоксилатном цикле). В связи с этим определенный интерес вызывают исследования особенностей функционирования ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути и их роли в механизме адаптивной реакции бактериального метаболизма к смене типа питания.

Совершенно отсутствует информация о роли генетических структур в регуляции транскрипции генов *icl*, *aco*, *sdh*, кодирующих биосинтез ферментов, которые обеспечивают функционирование цикла Кребса, глиоксилатного пути и глюконеогенеза в разных штаммах *S.natans* при смене типов аэробного культивирования и питания.

Целью данной работы являлось изучение регуляции ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути, их экспрессии и изменения изоферментного состава при переходе с хемоорганотрофного на литоорганотрофный тип питания у *S.natans*.

В соответствии с заданной целью были поставлены следующие **задачи**:

1. С помощью условий аэробного культивирования и смены типов питания смоделировать хемолитогетеротрофный тип питания у бактерий *S.natans* штаммов Д-501 и Д-507.
2. Изучить изменение активности и изоферментного состава ключевых ферментов ЦТК, глиоксилатного пути и глюконеогенеза (аконитатгидратазы, сукцинатдегидрогеназы и изоцитратлиазы) у бактерий *S.natans* при смене условий аэробного культивирования и типа питания.
3. Разделить с помощью ионообменной хроматографии изоформы АГ и СДГ из исследуемых бактерий и получить их высокоочищенные препараты с высокой удельной активностью.
4. Изучить кинетические (K_m) и регуляторные (рН-зависимость) характеристики конститутивных и индуцибельных форм АГ и СДГ в бактериях *S.natans* при переходе с хемогетеротрофного на хемолитоорганотрофный тип питания.
5. Выяснить влияние микроаэробных условий (штамм Д-501) и миксотрофного питания (штамм Д-507) на концентрацию транскриптов гена *icl*, кодирующего маркерный фермент глиоксилатного цикла – изоцитратлиазу.

6. Исследовать изменение относительного уровня транскриптов генов *aco* и *sdh*, кодирующих исследуемые ферменты при органотрофном и хемолитоорганотрофном типе питания штаммов Д-501 и Д-507 *S.natans*.
7. Предложить гипотетическую схему трансформации углеродного метаболизма в бактериях *S.natans* при смене условий культивирования и типов питания.

Научная новизна. Установлено, что у бактерий в микроаэробных условиях (штамм Д-501) и при миксотрофном питании (штамм Д-507) индуцируется глиоксилатный цикл. Об этом свидетельствует появление высокой активности изоцитратлиазы и высокий уровень транскриптов *icl*. Увеличение активности СДГ и АГ сопровождалось индукцией дополнительных изоформ этих ферментов, при этом наблюдалось резкое возрастание концентрации транскриптов их генов *aco* и *sdh*. Разделение изоформ СДГ и АГ позволило исследовать их специфические свойства и установить отличия в кинетических (K_m) и регуляторных (рН-оптимум) характеристиках, что может свидетельствовать об участии индуцибельных изоформ в других метаболических процессах (глиоксилатный путь и глюконеогенез).

Практическая значимость. Результаты диссертационной работы расширяют и углубляют знания о роли ключевых ферментов цикла Кребса, глиоксилатного пути и глюконеогенеза в адаптивной реакции бактериального метаболизма разных штаммов *S.natans* при переходе с хемогетеротрофного питания на хемолитоорганотрофный тип питания. Разделение конститутивных и индуцибельных изоформ СДГ и АГ и получение их препаратов в высокоочищенном состоянии открывает перспективы для их применения в научно-исследовательской работе, как вспомогательных ферментов при изучении других ферментов.

Материалы диссертации используются в учебном процессе на медико-биологическом факультете Воронежского госуниверситета при чтении лекций по биохимии, микробиологии, а также спецкурсах «Молекулярная

биология», «Энзимология» и др. Полученные результаты применяются при проведении практикумов и выполнении курсовых, бакалаврских и магистерских работ.

Положения, выносимые на защиту

1. Хемолитогетеротрофный тип питания бактерий *S.natans* можно индуцировать микроаэробным культивированием в присутствии восстановленных соединений серы (штамм Д-501). Бактерии штамма Д-507 переходят на хемолитоорганотрофный тип питания при миксотрофном питании независимо от условий аэробного культивирования.
2. Переход бактерий к хемолитогетеротрофии сопровождается индукцией глиоксилатного цикла, на что указывает резкое увеличение активности изоцитратлиазы (маркерного фермента этого пути) и сильное возрастание концентрации транскриптов гена *icl*, обуславливающего биосинтез фермента ИЦЛ.
3. При смене условий аэробного культивирования и типов питания в бактериях *S.natans* наблюдается резкое увеличение активности и изменение изоферментного состава ключевых ферментов ЦТК, ГЦ и глюконеогенеза – аконитатгидратазы и сукцинатдегидрогеназы. Дополнительные изоформы, отличающиеся по кинетическим свойствам, участвуют в адаптации к смене типа питания. Индуцированная изоформа АГ обеспечивает функционирование глиоксилатного цикла, а дополнительная форма СДГ участвует в утилизации сукцината, возникающего в ГЦ.
4. Разделение с помощью ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Sepharcel изоформ АГ и СДГ и получение их препаратов в высокоочищенном состоянии дало возможность провести сравнительное изучение их регуляторных свойств. Установлено отличие в сродстве к субстратам и рН-зависимости индуцибельных изоформ по сравнению с конститутивными.

5. Смена хемогетеротрофного питания на хемолитоорганотрофный тип питания у *S.natans* сопровождается резким увеличением концентрации транскриптов генов *aco* и *sdh*, что, по-видимому, указывает на участие кодируемых этими генами ферментов АГ и СДГ, не только в ЦТК, но и в ГЦ и в глюконеогенетической утилизации сукцината.
6. Предлагается гипотетическая схема трансформации углеродного метаболизма в бактериях *Sphaerotilus natans* subsp. *Sulfidivorans*. При смене условий культивирования и типов питания осуществляется адаптивная реакция клеточного метаболизма, обеспечивающая устойчивое функционирование этих бактерий. Индукция маркерного фермента (ИЦЛ) глиоксилатного цикла и ключевых ферментов ЦТК (АГ и СДГ) в микроаэробных условиях и при миксотрофном питании у бактерий штамма Д-501 и Д-507 осуществляется на молекулярно-генетическом уровне.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на международных, региональных и университетских конференциях. Они были представлены на межрегиональных конференциях, посвященных памяти Землянухина А.А., «Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов» (Воронеж, 2014, 2015, 2017), на УП Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых биологов (Новосибирск, 2015), на 16 международной школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2012), ежегодных научных сессиях, отчетных конференциях преподавателей и сотрудников Воронежского госуниверситета (2013-2017).

Публикации. Основные результаты настоящей диссертационной работы изложены в 8 публикациях и тезисах.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы (216 источников). Иллюстрационный материал включает 13 таблиц и 29 рисунков.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Особенности серного метаболизма у бактерий *Sphaerotilus natans*

Системы активированного ила, используются во всем мире для очистки сточных вод. Одной из основных эксплуатационных проблем таких систем является чрезмерный рост нитчатых бактерий. Это приводит к плохой переработке активированных хлопьев осадка, что обычно называют зарастанием. *Sphaerotilus natans*, относящиеся к классу β -протеобактерий, считаются первичными организмами, которые вызывают зарастание, поэтому ряд исследований был проведен именно на них (Takeda et al, 1998; Takeda et al., 2000). Хотя и другие виды нитчатых бактерий, как известно, участвуют в данном процессе (Kanagawa et al., 2000). Дженкинс и соавт. (Jenkins et al., 1993) сообщают, что *S. natans* являются доминирующими нитчатыми микроорганизмами в 12% из 525 образцах ила в Соединенных Штатах. Таким образом, можно заключить, что именно *S.natans* вызывают зарастание ила.

Структура *S.natans* характеризуется наличием длинных цепочек палочковидных клеток (Mulder et al., 1989). Однако, при определенных условиях культивирования, этот организм растет как отдельные клетки без формирования оболочки. Поскольку только нитчатая структура является причиной зарастания активного ила, изучаются условия роста, которые определяют клеточные формы. Гауди и Вулф (Gaudy et al., 1961) сообщили, что *S. natans* растут в виде отдельных клеток в присутствии 0.5% глюкозы и 0,5% пептона, но формируют нити в присутствии 0,1% глюкозы и 0,1% пептона. Кроме того показано, что в аэробных условиях (7.6 ± 0.1 мг/л), данный вид микроорганизмов рос в основном в виде отдельных клеток, в то время как истощение концентрации кислорода (до ~ 3 мг/л) индуцировало ее нитчатую структуру (доля одиночных клеток уменьшилась с $83,3 \pm 5,9$ до

14,3 ± 3.4%, тогда как количество нитей увеличилось с 16.7 ± 5,9 до 85.7 ± 3.4%) (Seder-Colomina et al., 2015).

На сегодняшний день род *Sphaerotilus* представлен тремя видами: *S. natans*, *S. montanus* и *S. hippie*. В составе вида *S. natans* выделено 2 подвида. Гетеротрофные штаммы, включая типовой вид рода, объединены в подвид *S. natans ssp. natans*. Штаммы, способные к хемолитоорганотрофному типу питания с восстановленными соединениями серы и обитающие в сероводородных биотопах составляют подвид *S. natans ssp. sulfidivorans* (Гриднева и др., 2009). Неорганические соединения серы широко распространены в природе, и микроорганизмы занимают центральное место в их трансформации, что играет ключевую роль в глобальном цикле серы (Pokorna, Zabranska, 2015). В качестве донора электронов для диссимилиации внешний H_2S окисляется до сульфата с помощью сероокисляющих бактерий (Luther et al., 2011; Hanson et al., 2013).

Кроме того, сероводород может быть трансформирован посредством взаимодействия с абиотическими металлами, такими как железо (III) и Mn (IV) (Hansel et al., 2015).

Реакции переноса серы играют важную роль в ряде биосинтетических путей, таких как тиоляция тРНК и синтез железо–серных кластеров, тиамина, молибдоптеринового кофактора, биотина (Kessler, 2006). Хорошо известно, что поставка серы к этим путям предполагает последовательное преобразование серы в персульфид между несколькими белками, многие из которых высоко консервативны у разных видов. Ферментативная генерация персульфидной серы, переноса сероводорода как персульфида между различными белками и окисление сероводорода в белково-связанной форме также являются существенными компонентами путей серного окисления, которые связаны с преобразованием энергии с помощью фотосинтеза или дыхательных процессов (Stockdreher et al., 2014). В этих диссимилиационных путях восстановленные соединения серы служат донорами электронов для

анаэробного фототрофного и аэробного или анаэробного хемотрофного типов питания и в основном окисляются до сульфата (Frigaard, Dahl, 2009).

Достаточно большое значение в глобальном серном цикле играют процессы окисления сульфида, элементной серы, тиосульфата и сульфита. Микробиологическое окисление сульфидов состоит из ряда этапов, первым из которых является окисление H_2S до S^0 , при посредничестве мембраносвязанной электронтранспортной цепи. Две ферментные системы окисления сульфидов катализируют данный процесс, флавоцитохром с, сульфид:цитохром-с-оксидоредуктаза (FCC) и сульфид:хинон оксидоредуктаза (SQR) (Griesbeck, Günter, 2000). Ген *sqr* был описан для большинства сульфид-окисляющих прокариот, принадлежащих к протеобактериям, хлороби, цианобактериям и археям (Pham et al., 2008). Похоже, что *sqr* является ключевым ферментом для окисления сульфида: мутации данного гена у *Rhodobacter capsulatus* приводят к потере возможности использовать сульфид (Schütz et al., 1999), в то время как мутации *fcc* у *Chromatium vinosum* не влияют на ее способность использовать данное производное серы (*C. vinosum* также имеется копия *sqr* (Reinartz et al., 1998).

Диссимиляционные сульфит-редуктазы, кодируемые генами *dsrAB* (Wagner et al., 1998), обнаруживаются у всех известных сульфатредуцирующих прокариот. *DsrA* является основным ферментом в диссимиляционном пути сульфатредукции и катализирует шестиэлектронное восстановление бисульфита до сульфида в последнем шаге сульфатного дыхания (Kondo et al., 2008; Bradley et al., 2011).

Сероокисляющие прокариоты весьма разнообразны, и универсального механизма для окисления восстановленных соединений серы не существует (Dahl et al., 2008; Wiley et al., 2009). Пути полного окисления, такие как Sox путь окисления тиосульфата, как правило, найдены у факультативных хемолитоорганотрофов как альфапротеобактерий *Paracoccus pantotrophus* [Friedrich et al., 2001; Zander et al., 2010). Периплазматический ферментный

комплекс Sox широко распространен среди различных филогенетических групп сероокисляющих бактерий, которые окисляют тиосульфат до сульфата с/без формирования серных глобул в качестве интермедиата. Гетеродимерный SoxYZ белок является ключевым в данном метаболическом пути и ковалентно связывается с остатком цистеина, расположенным рядом с С-концом субъединицы SoxY (Sauvé et al., 2007). С-тип цитохрома SoxXA катализирует формирование окислительной деструкции дисульфидных связей между сероводородом, тиосульфатом и цистеином SoxY (Bamford et al., 2002). Сульфоновая группа высвобождается гидролитически в реакции, катализируемой SoxB (Sauvé et al., 2009). У некоторых организмов, содержащих Sox белки, следующим шагом является окисление SoxY-связанного сероводорода в сульфон хемолибдобелком SoxCD и гидролитическим выходом сульфата (Zander et al., 2010). В другой группе окислителей серы SoxCD нет, и было высказано предположение, что SoxL, белок, содержащий типичный роданазный (например, тиосульфат:акцептор серы трансферазы) домен, катализирующий перенос SoxY-связанного сероводорода в нуль-валентную серу, которая хранится в качестве интермедиата либо во внеклеточной, либо во внутриклеточной серной глобуле (Welte et al., 2009). Однако убедительных биохимических и генетических доказательств этого предложения еще не было.

Для представителей *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* subsp. nov. ранее была показана способность к хемолитоорганотрофному типу питания в присутствии восстановленных соединений серы на биохимическом уровне. Способность к миксотрофному типу питания индуцируется у большинства штаммов в микроаэробных условиях (Гриднева и др., 2009).

1.2. Регуляторные аспекты функционирования сукцинатдегидрогеназной ферментной системы

Сукцинат:убихинон оксидоредуктазу (СУР, КФ 1.3.5.1) обычно называют комплексом II митохондриальной и бактериальной дыхательной цепи. Члены этой группы ферментов могут быть классифицированы в зависимости от направления реакции, которую они катализируют в организме. Сукцинат:хинон редуктазы (СУР) осуществляют окисление сукцината до фумарата в сочетании с восстановлением хинона в хинол, в то время как обратная реакция окисления хинола в сочетании с восстановлением фумарата катализируется хинол:фумаратредуктазой (ХФР) (Hägerhäll, 1997). Сукцинатдегидрогеназная активность фермента необходима для нормального функционирования цикла трикарбоновых кислот. Во время аэробного метаболизма сукцинатдегидрогеназа (СДГ, SdhCDAB, комплекс II, КФ 1.3.99.1) кишечной палочки катализирует окисление сукцината до фумарата и, в конечном счете, переводит химическую энергию на убихиноновый пул, чтобы использовать ее в дальнейшем при восстановлении кислорода цитохромоксидазой. Расположенный в бактериальной внутренней мембране фермент состоит из двух доменов: растворимого димера СДГАВ, который привязан к внутренней мембране СДГСD-трансмембранным доменом. Окисление сукцината происходит с помощью флавин-аденин-динуклеотидного (ФАД) кофермента, который ковалентно присоединен к гистидину субъединицы СДГА. При окислении сукцината до фумарата освобождаются два электрона (и 2H^+), которые передаются непосредственно на ФАД, а далее последовательно через ряд железо-серных кластеров субъединицы В на убихинон (Tran et al., 2006).

У *Escherichia coli* активность СУР проявляется в аэробных условиях, в то время как у его гомолога хинол:фумарат-редуктазы (ХФР) - в анаэробных или микроаэробных условиях, когда стеарилфумарат используется в качестве

акцептора электронов при дыхании (Cecchini, 2003). Мембраносвязанные СУР и ХФР бактерий и ферменты митохондриального комплекса II показывают большой процент структурной и функциональной гомологии (Iverson et al., 2012; Cecchini, 2003). Рентгеноструктурный анализ кристаллографического строения СДГ свиньи (Sun et al., 2005), курицы (Huang et al., 2006) и кишечной палочки (Yankovskaya et al., 2003), а также гомологичных им фумарат-редуктаз (Фрд) *Wolinella succinogenes* (Lancaster, 2002) и *E. coli* (Tomasiak et al., 2011), показывают значительное сохранение третичной архитектуры у ферментов семейства комплекса II. Митохондриальный комплекс II и СУР и ХФР *E. coli* состоят из четырех различных белковых субъединиц. Самая большая субъединица (~64-70 кДа) называется SdhA (в СУР) или FrdA (в ХФР), содержащая сайт связывания дикарбоксилата и ковалентно связанный ФАД. Остальная часть ферментного комплекса состоит из ~27-кДа SdhB/frdB субъединицы, в которой содержится три различных железо-серных кластера, и две включенных в мембрану субъединицы, SdhC/FrdC и SdhD/FrdD, которые вместе образуют сайт связывания хинона (Iverson et al., 2012; Cecchini, 2003).

Для комплекса II было предложено несколько систем классификации (Lancaster, 2002), однако, классификация на основании количества субъединиц мембраносвязанного домена и различия по составу гема b является наиболее общепринятой. Известно, что каталитические субъединицы проявляют высокую степень гомологии последовательностей у разных видов и для них установлены очень похожие структуры. Тогда как мембранные домены, напротив, демонстрируют значительные различия в их первичной структуре и в составе кофактора и, как полагают, способствуют проявлению уникальных свойств ферментов в различных биологических системах. Так, например, мембранный домен СДГ *S. cerevisiae* (Oyedotun, Lemire, 2004) состоит из двух небольших гидрофобных полипептидов, СДГ3p и СДГ4p, содержащих проксимальный и дистальный хинон-связывающие сайты, Q_p и Q_D, соответственно, и В-тип гема, схожий с ферментом,

выделенным из сердца свиньи (Sun et al., 2005). Поэтому в зависимости от трансмембранного домена различают пять типов СУР: А, В, С, D и Е (рис. 1). Ферменты только с одной мембранной субъединицей относятся к типу В в отличие от всех других типов, содержащих две гидрофобные белковые молекулы. Содержание гема варьируется от нуля (Тип D и Е) до одного (тип С) или двух (Тип А и В). К типу Е относятся так называемые неклассические СУР, содержащие две гидрофобные субъединицы с существенно отличающимися от типов А-Д свойствами (С.Р. Lancaster, 2000).

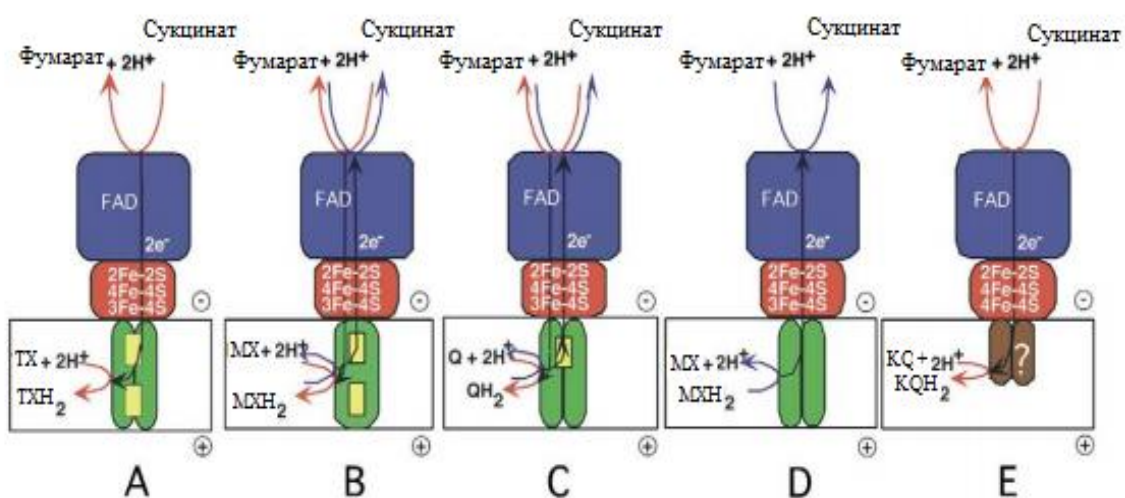


Рис. 1. Классификация (А-Е) СУР на основе их гидрофобного домена и связанного хирина. Гидрофильные субъединицы А и В показаны схематически синим и красным, соответственно, гидрофобные субъединицы С и D - зеленым. Гемовые группы символизируются как небольшие прямоугольники. Направления реакций, катализируемых СУР и ХФР, обозначены красными и синими стрелками, соответственно. Белые прямоугольники обозначают соответствующий цитоплазматический или бислой внутренней митохондриальной мембраны. Положительные (+) и отрицательные (-) стороны мембраны указаны. У бактерии отрицательная сторона – это цитоплазма ("внутри"), положительная сторона - периплазма ("снаружи"). Для митохондриальных систем, это митохондриальный матрикс и межмембранное пространство, соответственно. ТХ - термоплазма-хинон, МХ - менахинон, Q - убихинон и КХ - калдариелла хинон (Roy, Lancaster, 2003).

Интересно, что недавние исследования показали, что "неклассическая" (Тип Е) СУР из *Wolinella succinogenes* является фумаратредуктазой без сукцинатдегидрогеназной активности (Juhnke et al., 2009).

Окисление сукцината инициируется с помощью механизма переноса гидрид-иона, который отдает 2 электрона на ковалентно-связанный с первой субъединицей флавин-аденин-динуклеотид (ФАД) (Vik, Hatefi, 1981; Maklashina et al., 2016). Электроны затем поодиночке направляются через три железо-серных кластера в SdhB ([2Fe-2S], [4Fe-4S] и [3Fe-4S]) к хинон-связывающему сайту, где убихинон восстанавливается до убихинола.

Сукцинатдегидрогеназа *E. coli*, птиц и млекопитающих также содержит фрагмент гема В в мембранном домене (Oyedotun et al., 2007). Методом импульсного радиолиза был рассмотрен перенос одного электрона в комплексе II (сукцинат:убихинон оксидоредуктаза). Электроны изначально вводились в фермент на уровне [3Fe-4S] и убихинонового сайтов с последующим внутримолекулярным уравниванием фермента гемом В. Анализ данных с использованием теории Маркуса показывает, что наличие убихинона необходимо для эффективного переноса электронов к гему, который только постепенно уравнивается с [3Fe-4S] кластером при отсутствии хинона (Robert et al., 2014).

Сайт связывания дикарбоновых кислот расположен рядом с молекулой ФАД и может присоединять различные субстраты и ингибиторы, включая сукцинат, фумарат, оксалоацетат (ОАА), малонат, цитрат и 3-нитропропионат. Анализ рентгеновской кристаллографической структуры СДГ, связанной с различными ингибиторами, свидетельствует о разнообразии SdhA-R286 и SdhA-H242 боковой цепи, в то время как у других остатков мало или нет изменчивости. Исследование фумаратредуктазы *W. succinogenes* показало, что положительный заряд FrdA-R301 (эквивалент SdhA-R286) имеет важное значение для катализа и ковалентного присоединения ФАД (Lancaster et al., 2001). Выявлено, что гем, входящий в состав СДГ, не участвует в катализе сукцината или фумарата, и его функции в передаче электронов по-прежнему непонятны. Гем может иметь структурную роль в стабилизации двух трансмембранных субъединиц; однако, потеря гема у мутантов *E. coli* не влияла на стабильность фермента

(Iverson et al., 1999). Предполагается, что гем может быть вовлечен в предотвращение образования активных форм кислорода (АФК) в процессе переноса электронов от ФАД до убихинона, действуя как конденсатор во время высокого потока электронов (Yankovskaya et al., 2003). Кроме того, в исследованиях мутантов *S. cerevisiae* СДГ, не содержащая в своем составе гема, способна к ассоциации, поддержанию роста бактерий на несбраживаемых источниках углерода и сукцинат-зависимому восстановлению хинона. Атомистическое молекулярно-динамическое моделирование подтвердило вывод, что гем b придает некоторую структурную стабильность ферменту, но не является обязательным для передачи электронов от сукцината на убихинон (Oyedotun et al., 2004).

Первоначальные исследования связи между гемом и комплексом мембраносвязанных субъединиц СДГ описывается с помощью гем-дефицитных штаммов *Bacillus subtilis*, где редукция синтеза гема повлекла за собой уменьшение количества изоформ СДГ3 и СДГ4 (Holmgren et al., 1979). Параллельно с этим уменьшением, СДГ1 (предположительно связанная с СДГ2) была найдена в цитозольной фракции в повышенном количестве. Это привело к выводу, что субъединицы, содержащие цитохром В, не могут закрепить комплекс СДГ1–СДГ2 в отсутствие гема. Подтверждением этих наблюдений служит анализ мутантов *E. coli* с нокаутными генами трансмембранных субъединиц. У данных бактерий содержится только каталитический СДГ1–СДГ2 гетеродимер, обладающий сукцинат-оксидазной активностью в цитоплазматической фракции (Nihei et al., 2001). Замена некоторых остатков тирозина (H84Y SDHC и SDHD H71Y), в виде одинарных или двойных мутантов, по-видимому, приводит к потере гема в СДГ в клетках *E. coli*, выращенных в микроаэробных условиях. Факт потери кофактора был подтвержден с помощью оптических и ЭПР спектров солюбилизованных мембран (Tran et al., 2007).

Недавно СДГ3–СДГ4 гем-содержащий домен был идентифицирован в другом, отдельном митохондриальном белковом комплексе. У *S. cerevisiae*

субъединица СДГ3 образует гетеродимер с Tim18 как часть TIM22 каналообразующего транслоказного белкового комплекса (Gebert et al., 2011). Эта транслоказная функция предназначена для импорта ядерно-кодируемого семейства белков-переносчиков в митохондрии (Chacinska et al., 2009). СДГ3 и Tim18, вероятно, формируют связанный с мембраной комплекс, очень похожий на СДН3/СДГ4 в СДГ. Интересно, что хинон-связывающий сайт СДГ3–СДГ4 сохраняется в СДГ3–Tim18, как с точки зрения структуры, так и по составу остатков, участвующих в формировании хиноновых лигандов (Maklashina et al., 2010; Gebert et al., 2011).

В *E. coli* паралоги СДГ и Фрд играют ключевую роль в аэробном и анаэробном дыхании, соответственно. Хотя СДГ оптимизирована для окисления сукцината и Фрд - для восстановления фумарата, сверхэкспрессирующиеся ферменты могут функционально заменять друг друга в естественных условиях (Maklashina et al., 1998). У *E. coli* паралоги содержат последовательности консервативных остатков вокруг ФАД, за исключением наличия остатка Gln (Q50) у СДГ, который заменен на остаток Glu (E49) у ферментов Фрд, свидетельствуя, что направленность катализа частично регулируется Coulombic эффектами (Maklashina et al., 2006). Другой определяющий фактор функциональной направленности включает в себя электрохимический профиль переноса электронов по редокс-кофакторам и преимущественном использованием типа хинона (Maklashina et al., 2013). Кроме того, потенциал восстановления ФАД (E_m) может также повлиять на направленность реакции. У фумаратредуктазы *Shewanella frigidimarina* $E_{m,7}$ нековалентного ФАДа составляет -152 мВ и фермент может катализировать только восстановление фумарата (Dobbin et al., 1999). У *E. coli* сукцинатдегидрогеназный и фумаратредуктазный кофактор ФАД ковалентно связан с СДГА-Н45 и Фрда-Н44, соответственно, через $\delta\alpha$ -Н3-гистидиловую связь (Weiner, Dickie, 1979; Walker, Singer, 1970). Варианты Фрд (FrdA-Н44Y/C/H/P) кишечной палочки и *Saccharomyces cerevisiae* СДГ (Sdh1-Н90S) с нековалентно связанным ФАД теряют активность

сукцинатдегидрогеназы, но сохраняют активность фумаратредуктазы (Robinson et al., 1994). В FrdA-H44S величина $E_{m,7}$ нековалентного ФАД была определена как -134 мВ, с использованием белковой вольтамперометрии. Повышение значений $E_{m,7}$, наблюдавшихся у ферментов, имеющих ковалентно-связанный ФАД ((-55 мВ в Фрд и -79 мВ в СДГ) (Ackrell, Cochran, 1989)), считается важнейшим фактором, определяющим их способность катализировать окисление сукцината, а также восстановление фумарата (Cecchini et al., 2002).

Несмотря на то, что проведено значительное количество исследований по выявлению особенностей структуры и функций каталитического комплекса II, пока еще очень мало данных о сборке зрелого ферментного комплекса. У *Saccharomyces cerevisiae* было предложено участие в сборке комплекса II гена, кодирующего Tcm62 (Dibrov, Fu, 1998), хотя его особой ролью может быть поддержание стабильности митохондриальных белков при стрессе (Klanner, Neupert, 2000).

Комплекс II дыхательной цепи и родственная ему фумаратредуктаза являются мембранно-связанными, сложными флавопротеидами с удивительно схожими физическими и каталитическими свойствами (Ackrell et al., 1992). Каждый комплекс может одновременно окислять сукцинат и восстанавливать фумарат, но есть четкое разграничение данных ролей в клетке. СУР функционирует у аэробных организмов, где она катализирует окисление сукцината до фумарата в качестве одного из этапов цикла Кребса и переносе электронов непосредственно на убихиноновый пул ($E_m = +100$ mV). Фумарат-редуктазный комплекс синтезируется анаэробами, когда фумарат заменяет кислород в качестве терминального акцептора электронов. Сопутствующий синтезу более низкий потенциал хинона способствует восстановлению фумарата. Факультативные прокариоты и эукариоты содержат тот или иной комплексы и соответствующие хиноны в зависимости от редокс-состояния клетки.

Почему клетки используют отдельные ферменты для окисления сукцината и восстановления фумарата непонятно. То, что Фрд *Escherichia coli* генерирует супероксид в воздухе является очень важным (Imlay, 1995), поскольку отклонения в продуцировании супероксида в мутантах по СУР нематоды *Caenorhabditis elegans*, как известно, приводят к преждевременному старению и смерти (Ishii et al., 1998). С другой стороны, восстановление фумарата СУР снижается (70-90%) в условиях высокого восстановительного потенциала ('диод туннельный эффект') (Pershad et al., 1999). Таким образом, СУР представляется неподходящей в качестве физиологического редуктора фумарата, что согласуется с наблюдением о менее эффективном росте *E. coli* при использовании СУР вместо ХФР в анаэробных условиях (Maklashina, Berthold, 1998).

Изолированные комплексы (Hägerhäll, 1997; Ackrell et al., 1992) могут быть разделены на две части. Гидрофильный домен состоит из флавопротеиновой субъединицы (Fr), к которой ковалентно присоединен кофактор ФАД и которая является частью каталитического центра, и железосерной субъединицы (Ir), содержащей три различных кластера $[2\text{Fe}-2\text{S v}]^{2+,1+}$, $[4\text{Fe}-4\text{S c}]^{2+,1+}$ и $[3\text{Fe}-4\text{S c}]^{1+,0}$ для транспорта электронов между ФАД и хиноном. Первичные последовательности Fr и Ir являются высоко гомологичными между видами и, следовательно, свидетельствуют об общих предках. Гидрофобные домены показывают большее разнообразие, состоят из одного или двух мембранных субъединиц с различными гемами В-типа и небольшой гомологией последовательностей. Эти анкоры содержат сайты связывания для хинона и ингибиторов. Бактериальные комплексы ориентированы с гидрофильного домена, выступающего в цитоплазму и якорных полипептидов, охватывающих цитоплазматическую мембрану. Эукариотические комплексы имеют схожую топологию, но применительно к матриксу митохондрий и внутренней мембране (Hägerhäll, 1997; Ackrell et al., 1992).

Флавопротеиновый полипептид (73-60 кДа) состоит из четырех доменов, включая большой ФАД-связывающий домен, содержащий Россмманнского типа (Rossmann-type) складчатость, характерную для ФАД-связывающих белков и покровный (capping) домен. Флавоцитохром С3 *Shewanella frigidmarina* однозначно содержит один домен для линейного ряда из четырех гемов, переносящих электроны к ФАД (Taylor et al., 1999); Leys et al., 1999). Значение структур *E. coli* L-аспартатоксидазы (LASPO) и флавоцитохрома, не имеющих связанного субстрата, заключается в обеспечении подвижности покровного домена при вращении от ФАД домена. Таким образом, активные остатки сайта, находящиеся в каждой из этих областей становятся дальше друг от друга. Остатки возвращаются на свое место в обсуждаемых ферментах из бактерий *Wolinella* и *Shewanella*, содержащих связанный фумарат (Taylor et al., 1999) или сукцинат (Leys et al., 1999) и в фумаратрезуктазе *E. coli* с присоединенным конкурентным ингибитором - оксалоацетатом. Очевидно, что связывание субстрата вызывает перемещение покровного домена, чтобы закрыть активный сайт от растворителя. Данный факт помогает объяснить наблюдение о повышении ковалентной связи ФАД с апоферментом Fr в присутствии субстрата (Robinson, Lemire, 1996).

LASPO и флавоцитохром С3 являются необычными фумаратредуктазами, которые растворимы, не способны окислять сукцинат и содержат нековалентный $\delta\alpha$ -(H3)-гистидил-ФАД. Изучение ферментных структур *Wolinella* и *Shewanella* позволило дополнить механизм транс-гидрирования фумарата, впервые предложенный Виком и Хатефи (Vik, Hatefi, 1981). Согласно первоначальной гипотезе присоединение фумарата происходит, по-видимому, с участием водородных связей одной карбоксильной группы к Arg A301 и другой к Arg A404 и His A369. Обмен гидрид ионами между N5 восстановленным флавином и субстратом β -метиленового углерода (β -methylene carbon) сопровождается протонированием α -метиленовой позиции молекулой воды, связанной

водородными связями с Arg A301 и Arg A404. На основании анализа *S. frigidmarina* ферментных структур можно сделать предположение, что остаток Arg A402/401 (эквивалент Arg A301/Wolinella) является донором протона, а не H₂O, а карбоксильные группы связываются с His A365/364. Стерические ограничения в активном сайте заставляют фумарат изменить свою конформацию, что наряду с перераспределением электронов из-за сильных полярных водородных связей на одном конце молекулы «открывает» фумарат для отрыва гидрид-иона от β-углерода. Важно, что обнаруженный малат-подобный промежуточный продукт, заключенный в «закрытый» активный центр окисленного фермента из бактерий *Shewanella* (Lancaster et al., 1999), свидетельствует, что в отсутствие гидрида β-углерод подвергается воздействию H₂O и что этот этап предшествует переносу протона.

Ir субъединицы (24-31 кДа) имеют N-терминальный «растительный ферредоксинный» домен, содержащий [2Fe–2S]^{2+,1+} кластер и C-терминальный «бактериальный ферредоксиновый» домен с [4Fe–4S]^{2+,1+} и [3Fe–4S]^{1+,0} кластерами. Три консервативные группы цистеина в последовательности являются лигандами (Hägerhäll, 1997). Новая группа СУР и ХФР архей (например, *Acidianus ambivalens*) и бактерий (например, *Methanococcus jannaschii*) характеризуется отсутствием канонического [3Fe–4S] кластера, но имеет в своем составе лишний цистеин в последовательности, предполагая наличие дополнительного [4Fe–4S] кластера (Gomes et al., 1999). Тогда как замена нативного 3Fe кластера на 4Fe может быть достигнута путем введения цистеина в ХФР *E. coli* (Mandori et al., 1992), но не для СУР *Bacillus subtilis* (Hägerhäll et al., 1995). Модификации кластеров являются пагубными для стабильности и/или активности фермента. Кристаллические структуры ХФР *E. coli* и *W. succinogenes* показывают консервативный характер Ir. Это объясняет, почему химеры железо-серной субъединицы человека и дрожжей вызывают активность у Ir-дефицитных дрожжей (Saghbini, Broomfield, 1994).

Рентгеновская кристаллография подтверждает близость [2Fe–2S] кластера с ФАД и нахождение [4Fe–4S] между кластерами [2Fe–2S] и [3Fe–4S] в линейном ряду. Данный факт развеивает последние сомнения относительно роли [4Fe–4S] в электронном транспорте из-за его характерного низкого потенциала (от -200 до -300 мВ (Hägerhäll, 1997), одним из объяснений которого является анти-кооперативные электростатические взаимодействия (Salerno, 1991). Целостность [3Fe–4S] необходима для присоединения Ir к анкерному домену и электронному обмену ФАД с хиноном. Расстояние 9-12 Å подходит для спин–спинового парамагнитного взаимодействия между соседними центрами (Hägerhäll, 1997) и для эффективного и направленного переноса электрона между ФАД и хиноном (Dutton et al., 1998). Относительно высокая стабильность констант свободнорадикальных форм ФАДа (2.5×10^{-2}) и связанного хинона (~ 10) позволяют взаимодействовать с одноэлектронными [2Fe–2S] и [3Fe–4S], соответственно (см. (Hägerhäll, 1997)).

Наиболее распространенный якорный домен состоит из двух полипептидов, С и D, с молекулярной массой 13-18 кДа и 11-16 кДа, соответственно, каждый белок содержит три трансмембранных α -спирали (I, II, III и IV, V и VI). N-конец каждого полипептида находится на (–) стороне мембраны, а С-конец – на (+) поверхности. Такие «якоря» содержат один или два протогема IX, или, как в ХФР *E. coli* ни одного гема. Другой тип «якоря» - это один полипептид (С; 23-30 кДа), содержащий все, кроме α -спирали III, и связывающий два гема (Hägerhäll, 1997).

СДГ термофильных бактерий *Thermus thermophilus* была выделена, идентифицирована и очищена до гомогенного состояния. Показано, что исследуемый фермент состоит из четырех полипептидов с предполагаемой молекулярной массой 64, 27, 14 и 15 кДа, что соответствует СДГА (флавопротеину), СДГВ (железо–серному белку), СДГС и СДГД (мембранным якорным белкам), соответственно. Наличие [2Fe–2S], [4Fe–4S] и [3Fe–4S] железо–серных кластеров было подтверждено методом ЭПР, в

ходе которого выявлено неизвестное ранее влияние субстрата на сигнал, соответствующий [2Fe–2S] кластеру (Olga Kolaj-Robin et al., 2011). Температурный оптимум для СДГ составил 70⁰С, что соответствует оптимальной температуре роста *T. thermophilus*. Исследуемый фермент был чувствителен к классическим ингибиторам активного центра, таким как малонат натрия, диэтил-оксалоацетат натрия и 3-нитропропионовая кислота. Измерения активности в присутствии семихинонного аналога, нонил-4-гидроксихинолин-N-оксида (NQNO) показали, что мембранная часть фермента функционально связана с активным центром. Стационарные кинетические измерения показали, что фермент подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен при низкой температуре (30⁰С) с K_m по сукцинату 0,21 мМ, но проявляет отклонение от нее при более высокой температуре (70⁰С). Это первый пример комплекса II с такой кинетикой поведения, что свидетельствует о положительной кооперативности с K' 0,39 мМ и коэффициентом Хилла 2.105 (Olga Kolaj-Robin et al., 2011).

Интегральный мембранный белковый комплекс, менахинол:фумарат редуктаза (mQFR) был очищен и охарактеризован из термофильных зеленых нитчатых аноксигенных фотосинтезирующих бактерий *Chloroflexus aurantiacus*. Комплекс состоит из трех субъединиц: 74 кДа флавопротеина, который содержит ковалентно связанный ФАД, 28 кДа полипептида, содержащего железо-серные кластеры и 27 кДа трансмембранного белка, который является также сайтом связывания двух В-типов гема и двух менахинонов. Очищенный комплекс имеет кажущуюся молекулярную массу 260 кДа. Изолированный комплекс активен в пробирке и при восстановлении фумарата и окислении сукцината. Кроме того, филогенетический анализ показал, что Фрд *C. aurantiacus* и *Chlorobium tepidum* наиболее близка дельта-протеобактериям (Yueyong Xin et al., 2009).

2-н-Гептил-4-гидроксихинолин-N-оксид (HOQNO) ингибирует сукцинат:хиноноксидоредуктазную активность изолированной и мембраносвязанной сукцинат:менахиноноксидоредуктазы из *B. subtilis*.

Пример ингибирования сходен с действием теноилтрифлорацетона и карбоксинов митохондриальной сукцинат:убихиноноксидоредуктазы: 90% активности фермента очень чувствительны к HOQNO (R_i 0.2 μ M для изолированного фермента), тогда как остальные 10% оказываются устойчивыми к ингибитору (Smirnova et al., 1995).

Jorge Morales с соавторами (Morales et al., 2009) исследовали комплекс II паразитических протистов *Trypanosoma cruzi* и обнаружили, что он состоит из шести гидрофильных (SDH1, SDH2_N, SDH2_C, и SDH5-SDH7) и шести гидрофобных (SDH3, SDH4 и SDH8-SDH11) закодированных в ядре субъединиц (рис. 2). Ортологи генов для каждой субъединицы были выявлены в *Trypanosoma brucei* и *Leishmania major*. В частности, железосерная субъединица представлена гетеродимером: SDH2_N и SDH2_C содержат растительного типа ферредоксиновый домен на N-конце и бактериальный ферредоксиновый домен на C-конце. Каталитические субъединицы (SDH1, SDH2_N, SDH2_C, SDH3 и SDH4) содержат все ключевые остатки,

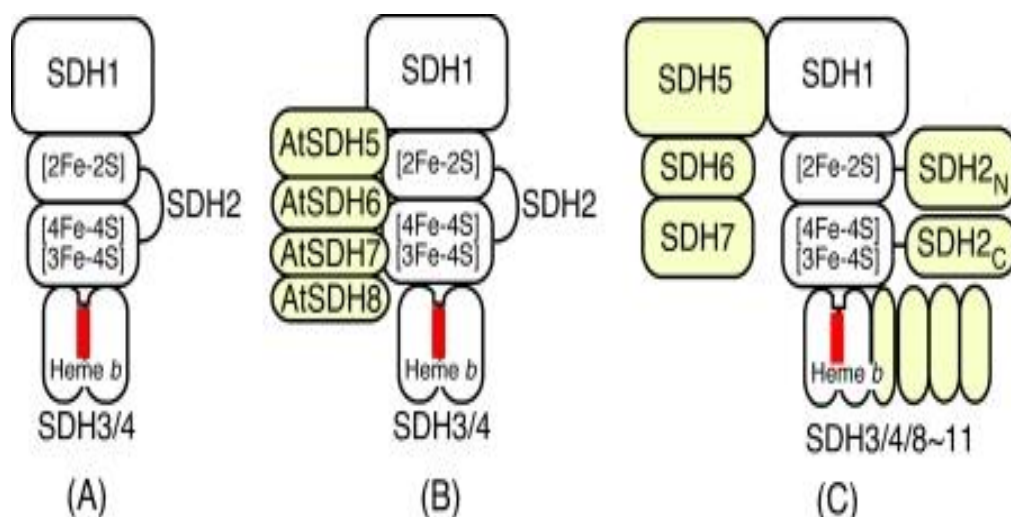


Рис. 2. Субъединичная организация комплекса II. А. четыре общие субъединицы комплекса II (млекопитающих, кишечной палочки); В. восьми-субъединичный комплекс II растений (*A. thaliana*); С. 12-субъединичный комплекс II *Trypanosomatida*. Некаталитические субъединицы и домены показаны желтым, гем b – красным (Morales et al., 2009).

необходимые для связывания дикарбоксилатов и хинонов, но фермент показал более низкое сродство к обоим субстратам и ингибиторам, чем ферменты млекопитающих. Кроме того, фермент связывает протогем IX, но в составе SDH3 не хватает гистидинового лиганда (Morales et al., 2009).

Изучение активности очищенной СУР *T. cruzi* показало различия в значениях K_m для Q1 ($33.9 \pm 3,6$ мкМ) и Q2 ($18.8 \pm 6,4$ мкМ). Значение V_{max} комплекса II *T. cruzi* было достаточно постоянным, для Q1 11.9 ± 2.2 и Q2 11.5 ± 0.4 единиц/мг белка, соответственно, что на $\frac{1}{4}$ меньше значений, показанных для ферментов СДГ быка и *E. coli* (Grivennikova et al., 1993; Maklashina, Cecchini, 1999). Это не удивительно, ведь комплекс II *T. cruzi* имеет примерно в 2-3 раза больше белков, чем у других ферментов. K_m для убихинона и сукцината составили $18.8 \pm 6,4$ мкМ (Q₂) и $1,48 \pm 0,17$ мМ, соответственно, что выше, чем 0,3 и 130 мкМ, соответственно, для фермента из сердца быка (Grivennikova et al., 1993), и 2 и 277 мкМ, соответственно, из фермента кишечной палочки (Miyadera et al., 2003). Примечательно, что значение K_m для сукцината было сопоставимо с 610 μ м у взрослых *A. suum* (Saruta et al., 1995), которая функционирует как хинол:фумарат-редуктаза в гипоксической среде обитания в организмах.

1.3. Физико-химические характеристики и регуляция изоцитратлиазы – маркерного энзима глиоксилатного цикла

Известно, что глиоксилатный шунт необходим для утилизации ацетата и жирных кислот, выступающих в качестве источников углерода для бактерий в определенных физиологических условиях. При этом он является одним из этапов глюконеогенеза (Maloy, 1980).

Глиоксилатный цикл - это альтернативный путь метаболизма органических кислот, когда цикл трикарбоновых кислот малоактивен из-за недостатка кислорода и питательных веществ (Епринцев, Попов, 2007). Когда большинство ферментов ЦТК подавляются, ферменты ГЦ

активируются. На первых этапах ГЦ напоминает ЦТК, и ацетил-КоА является единственным субстратом и для цикла Кребса и для глиоксилатного шунта (рис. 3). Однако природа используемого в данных циклах ацетил-КоА различна, в качестве источника могут выступать углеводы или липиды. Точка дифференциации для этих двух циклов начинается, когда ацетил-КоА преобразовывается в изоцитрат. Для функционирования глиоксилатного цикла требуется наличие двух важных ферментов: изоцитратлиазы и малатсинтазы. ИЦЛ осуществляет обратимое расщепление изоцитрата до глиоксилата и сукцината, а МС преобразует глиоксилат в малат добавлением ацетильной группы (Muñoz-Elías, McKinney, 2005).



Рис. 3. Общая схема реакций для ЦТК и глиоксилатного шунта. Изоцитратлиаза (ИЦЛ, обведено) - первый фермент, участвующий в ГЦ. Оксалоацетат может покинуть цикл в качестве субстрата глюконеогенеза (пунктирная стрелка).

Изоцитратлиаза также известна как изоцитраза, изоцитритатаза, изоцитратаза и изоцитратглиоксилат-лиаза (Baïroch, 2000). Данный фермент обнаружен у архей, бактерий, грибов, нематод, растений и протист. ИЦЛ

играет важную роль при прорастании семян высших растений, патогенности и резистентности микроорганизмов.

Показано, что помимо участия в глиоксилатном цикле, изоцитратлиаза имеет дополнительные функции. Во-первых, ИЦЛ вовлечена в бактериальные ответы на экологические стрессы. Ген *aceA*, кодирующий ИЦЛ у бактерий, индуцировался при высоких концентрациях солей в *Shewanella sp.* WP3 (Li et al., 2006) и при низкой температуре в *Colwellia maris* (Watanabe et al., 2002). Во-вторых, ИЦЛ требуется для патогенеза, резистентности и вирулентности *Mycobacterium tuberculosis* (Dunn, Ramírez-Trujillo, 2009; Muñoz-Elías, McKinney, 2005). Удаление гена *icl*, аналога *aceA*, приводит к снижению резистентности *M. tuberculosis* у мышей, указывая, что ИЦЛ имеет важное значение для выживания этой бактерии в клетках хозяина (Muñoz-Elías, McKinney, 2005; Sharma et al., 2000). Кроме того, ИЦЛ из фитопатогенных грибов *Leptosphaeria sp.* высоко-индуцирована при заражении семядолей *Brassica napus*, а инактивация гена приводит к низкой патогенности гриба из-за его неспособности использовать источники углерода, предоставляемые растением (Idnurm, Howlett, 2002).

На сегодняшний день, в общей сложности семь кристаллических структур ИЦЛ были изучены для пяти различных микроорганизмов: грибов *Aspergillus nidulans* [PDB id: 1DQU (Britton et al., 2000)], *Mycobacterium tuberculosis* [PDB id: 1F61 (Sharma et al., 2000)]; 1F8I (Sharma et al., 2000); 1F8M (Sharma et al., 2000), *Escherichia coli* [PDB id: 1IGW (Britton et al., 2001)], *Burkholderia pseudomallei* [PDB id: 3I4E (документ не опубликован)], *Brucella melitensis* [PDB id: 3EOL, 3P0X, 3OQ8, и 3E5B (документ не опубликован)], и *Yersinia pestis* [PDB id: 3LG3 (документ не опубликован)].

Структура ИЦЛ *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ) изучена Шармом и соавт. (Sharma et al., 2000) (PDB id: 1F61, 1F8I, 1F8M). Показано, что ИЦЛ является стабильной в виде димера, но функционирует только в тетрамерной форме (Sharma et al., 2000; Giachetti et al., 1987). Каждая субъединица содержит 428 аминокислотных остатков и состоит из 14 α -спиралей и 14 β -

тяжей. Необычный α/β -баррель, крупнейший основной домен, состоит из восьми α -спиралей ($\alpha 4$ – $\alpha 11$) и β -тяжей ($\beta 2$ – $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 12$ – $\beta 14$), соответственно. Спираль $\alpha 12$ (аминокислотные остатки 349-367) движется в направлении от данного барреля, а затем соединяется еще с двумя спиральями, $\alpha 13$ (остатки 370-384) и $\alpha 14$ (остатки 399-409), для обеспечения взаимодействия с соседними субъединицами. Небольшой β -домен, состоящий из коротких скрученных β -листов ($\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 9$ – $\beta 11$) и нескольких остатков активного сайта, расположен на вершине α/β -барреля. Одной значительной особенностью данной структуры является межсубъединичная спираль, обменивающая $\alpha 12$ и $\alpha 13$ между двумя кристаллографически связанными субъединицами, которые отвечают за формирование тетрамерной структуры. Подобная возможность образовывать стабильные димеры найдена и для других белков (Bennett, Schlunegger, 1995). 1F61 – это лиганд-свободная ИЦЛ, которая имеет активный сайт «открытой конформации». 1F8I и 1F8M – ИЦЛ, которая связывает сукцинат/глиоксилат и пируват, соответственно. Связывание лиганда приводит к конформационному изменению, приводящему к сдвигу активного сайта ИЦЛ в «закрытую конформацию». Исследован каталитический механизм формирования изоцитрата из глиоксилата и сукцината, и наоборот. Глиоксилат, вероятно, связывается с ИЦЛ раньше сукцината. Изучен механизм расщепления изоцитрата до глиоксилата и сукцината, авторы предложили, что C–C связь изоцитрата расщепляется через конденсацию Кляйзена (Claisen condensation). Однако для изучения данного процесса необходимо рассматривать изоцитрат-ИЦЛ комплексную структуру, которая в данный момент недоступна для дальнейшего подтверждения вышеупомянутой гипотезы (Bennett, Schlunegger, 1995).

Изоцитратлиаза *E.coli*, также как и ферменты других прокариот, находится в цитоплазме, в то время как у растений, простейших, водорослей и грибов данный фермент локализуется в глиоксисомах. Сравнение строения прокариотической ИЦЛ с ее эукариотическими аналогами, выделенными из грибов *Aspergillus nidulans*, показывает различия доменной структуры

вследствие удаления около 100 аминокислотных остатков от более крупного эукариотического фермента. Несмотря на это, активные сайты прокариотических и эукариотических ферментов очень тесно связаны между собой (Britton et al., 2001).

Муньос-Элиас и Маккинни (Muñoz-Eliás, McKinney, 2005) показали, что имеется два типа МТБ ИЦЛ (ИЦЛ1: прокариотически-подобная изоформа и ИЦЛ2: эукариотически-подобная изоформа), совместно необходимые для выживания МТБ. Показано, что отсутствие одной из изоформ ИЦЛ не влияет на жизнеспособность МТБ, но отсутствие обеих изоформ приведет микобактерий к гибели. Эти две изоформы кодируются генами *icl* (ИЦЛ1) и *ace A* (ИЦЛ2), соответственно (Li et al., 2008). Причем изоформа ИЦЛ2 менее активна по сравнению с ИЦЛ1 и обнаруживается не во всех штаммах микобактерий (Höner et al., 1999). Кроме того, Гулд и соавт. (Gould et al., 2006) сообщили, что МТБ ИЦЛ1 выполняет двойную роль, участвуя в глиоксилатном и метилцитратном циклах. Метилцитратный цикл - это механизм, который удаляет пропионил-КоА, токсичный побочный продукт бета-окисления липидов. В данном цикле участвуют три фермента - метилцитратсинтаза, метилцитратдегидрогеназа и 2-метилизоксипропанатлиаза (МЦЛ). Выяснилось, что МТБ производит только метилцитратсинтазу и метилцитратдегидрогеназу, но не МЦЛ. Функцию последней осуществляет ИЦЛ1, что делает ее очень значимой (Gould et al., 2006).

Показано, что изоцитратлиаза *Bradyrhizobium japonicum*, кодируемая геном *aceA*, играет важную роль при адаптации данного организма к засухе (Jeon et al., 2015). Данный факт подтверждает гипотезу, что *aceA* участвует в обеспечении механизмов устойчивости бактерий к различным экологическим стрессам. Активность *aceA* увеличивается при засолении и в условиях «кислотного шока» у *Shewanella sp.* WP3 и *M. tuberculosis* соответственно (Li et al., 2006; Fisher et al., 2002). При H₂O₂-опосредованном окислительном стрессе экспрессия *aceA* также индуцировалась (Jeon et al., 2011). Кроме того, активность ИЦЛ в *Pseudomonas* возросла более чем в четыре раза в

алюминиево-насыщенной среде (Hamel et al., 2004). Повышение активности ИЦЛ также наблюдалось у *Cladosporium sphaerosperum* в присутствии соли (Karlekar et al., 1985).

Изоцитратлиаза, один из ключевых ферментов глиоксилатного цикла, катализирующий обратимое расщепление изоцитрата в сукцинат и глиоксилат. Фермент проявляет свою каталитическую активность только в присутствии ионов Mg^{2+} . Оптимальная каталитическая скорость работы фермента наблюдается у растительных, а также бактериальных и грибковых изоцитратлиаз при концентрации Mg^{2+} в диапазоне 1±5 и 8 мМ (Vanni et al., 1990). Более высокие концентрации являются ингибирующими. Изоцитратлиаза из кукурузы представляет собой тетрамерный белок, состоящий из идентичных субъединиц с молекулярной массой 64 кДа каждая (Khan et al., 1992). Интересно, что при исследовании изоцитратлиазы из семян амаранта выявлены две формы фермента – цитоплазматическая и глиоксисомальная (Eprintsev et al., 2015). Цитозольная форма имела низкий оптимум pH (6,5), активировалась ионами Mn^{2+} , тогда как Mg^{2+} не влиял на активность данного энзима, и имела более низкое сродство к D, L-изоцитрату (K_m 63 мкМ) по сравнению с глиоксисомальной формой (оптимум pH 7,5, K_m 45 мкМ), которая была активирована Mg^{2+} .

Исследование ИЦЛ из *Mycobacterium tuberculosis* показало, что при физиологических значениях pH фермент самоорганизуется в фибриллярную структуру при отсутствии соли в пробирке. Данная структура MtbICL является динамичной и восстанавливается в тетрамерную, а также начинает проявлять изоцитратлиазную активность при добавлении соли (Shukla et al., 2017).

В настоящее время, определены несколько ингибиторов ИЦЛ, такие как итаконат (McFadden, Purohit, 1977), 3-нитропропионат (Schloss, Cleland, 1982) и 3-бромопируват (Ко, McFadden, 1990). Сингх и Гош (Singh, Ghosh, 2006) показали, что и ИЦЛ и изоцитратдегидрогеназа (ИДГ) конкурируют за один и тот же субстрат, изоцитрат. Предложен новый метод ингибирования

ИЦЛ с помощью увеличения концентрации ИДГ. Это также свидетельствует о том, что ИДГ имеет большее сродство к изоцитрату по сравнению с ИЦЛ. Однако ИДГ-киназа препятствует ингибирующему действию ИДГ, что позволяет ИЦЛ связать изоцитрат и активировать глиоксилатный путь. Соответственно, ингибирование ИДГ-киназы также может привести к снижению скорости функционирования ИЦЛ (Singh, Ghosh, 2006).

Исследование кинетических характеристик очищенных рекомбинантных изоферментов изоцитратлиазы из *M. tuberculosis* показало, что ИЦЛ1 имеет большее сродство к субстрату, чем ИЦЛ2. Так, величина K_m ИЦЛ1 по трео-D(s)L(s)-изоцитрату равняется 188 μM , а значение K_m ИЦЛ2 - 1.2 мМ. Интересно, что K_m ИЦЛ1 по DL-трео-2-метилизцитрату составила 718 μM , тогда как для ИЦЛ2 данный показатель превышал концентрацию 15 мМ, более точные измерения были затруднены из-за ограничений в растворимости метилцитрата (Gould et al., 2006).

Получение гомогенного препарата ИЦЛ из психрофильных бактерий *Colwellia maris* позволило установить массу нативного фермента, которая составила 24 кДа, с массой субъединиц 64,7 кДа (Watanabe et al., 2001). ИЦЛ, выделенная из *C. maris*, является термолабильным ферментом, функционирующим в пределах 10-30⁰С, с температурным оптимумом – 20 °С. На работу данного энзима существенное влияние также оказывал и рН среды, максимальную активность изоцитратлиаза проявляла при рН 6,8. Значение K_m по DL-изоцитрату составило 510 μM (Watanabe et al., 2001). Изоцитратлиаза из облигатных метилотрофных бактерий *Nurphomicrobium methylovorum* GM2 является гомотетрамером с молекулярной массой субъединиц 62 кДа. Фермент стабилен в диапазоне значений рН 7,5-9,0. Максимальная активность наблюдалась при рН 7,5 и 45 °С. K_m по Ds-изоцитрату составила 0,51 мМ. Активность фермента активируется ионами Mg^{2+} и ингибируется оксалатом, сукцинатом и гликолатом (Tanaka et al., 1997).

1.4. Функции аконитатгидратазы и особенности ее регуляции

Суперсемейство аконитгидратаз состоит из углерод-кислородных гидролаз, содержащих [4Fe-4S]-кластеры. Они включают не только привычные митохондриальные и бактериальные аконитатгидратазы, которые катализируют обратимую изомеризацию цитрата в изоцитрат через цис-аконитат в цикле трикарбоновых кислот, а также грибковые и бактериальные изопропилмалатизомеразы (IPMIs) и грибковые гомоаконитазы (Gruer, Artymiuk, 1997). Большинство членов суперсемейства аконитаз являются мономерными белками, включающими четыре структурных домена, расположенных вокруг каталитического [4Fe-4S] кластера. Митохондриальная аконитатгидратаза (МАГ), выделенная из сердца свиньи (Lauble et al., 1992) является структурным архетипом, с ее четырьмя доменами, организованными как 1-2-3-линкер-4. Немного отличается от нее структура, которая является общей для бактериальных аконитаз, а также грибковых IPMIs и эукариотических цитоплазматических аконитаз/железорегуляторных белков (IRP). Аконитазы содержат неизвестные мотивы узнавания РНК (Kaldy et al., 1999). До сих пор модели взаимодействия фермента с железо-чувствительными элементами (IRE) построены исключительно на основе мутагенезного анализа с использованием монофункциональных не-РНК-связывающих МАГ в качестве модели. Сайт-направленный мутагенез IRP1 позволил выявить два региона, которые существенно влияют на связывание IRE (Kaldy et al., 1999): один из которых расположен на входе в активный центр и другой, расположенный на противоположной стороне белка.

Структура цАГ, расшифрованная Дупу и соавт. (Dupuy et al., 2006), представлена железо-содержащей формой, которая не связывает РНК. Несмотря на то, что активный центр фермента очень похож на МАГ, существуют значительные различия в пространственной конформациях

домена 4 и доменов 1-3 и в том, как они связываются друг с другом, образуя выемку рядом с активным центром. Отдельные аминокислотные замены и вставки из различных частей аминокислотных последовательностей, как показано, расположены близко друг к другу в трехмерной структуре. Эти изменения комбинируются, чтобы изменить активный центр и создать крупный положительно заряженный участок, потенциально способный стабилизировать сахар-фосфатный остов РНК. Эти наблюдения позволяют предложить подробную, хотя пока еще умозрительную, модель для связывания РНК. Она предлагает вращение на 20° домена 4 от исходного положения близко к доменам 1-3 для размещения IRE. Тогда комплекс может быть стабилизирован взаимодействием между отрицательно заряженными остатками сахарофосфатного остова IRE и вновь образованной положительно заряженной области цАГ (Artymiuk, Green, 2006).

Ассоциация домена 4 с другими доменами варьируется у некоторых представителей суперсемейства. Так, аконитаза В кишечной палочки, самый дальний член суперсемейства, имеет доменную организацию, в которой наблюдаются циклические перестройки аминокислотных последовательностей в следующем порядке: 4-линкер-1-2-3, и, кроме того, она также имеет дополнительные 160 остатка HEAT-подобного домена на N-конце (Williams et al., 2002; Tang et al., 2005). Кроме того, бактериальные изопропилмалатизомеразы являются гетеродимерами с доменом 4 на отдельной полипептидной цепи напротив доменов 1 - 3 (Gruer, Artymiuk, 1997), и, действительно, о структуре изолированного домена 4 уже сообщалось (Yasutake et al., 2004), свидетельствуя, что данный домен способен существовать самостоятельно. Поэтому предложение перемещения домена 4 в IRP/IRE комплекс кажется вполне разумным (Artymiuk, Green, 2006).

Интересно, что *Escherichia coli* содержит две различные аконитазы, АГА и АГВ (Jordan et al., 1999). Физиологические, молекулярно-генетические и биохимические исследования показали, что наименее стабильный фермент

АГВ - это основной фермент, участвующий в цикле лимонной кислоты, который синтезируется во время экспоненциального роста, в то время как АГА - это стресс-индуцированный стационарный однофазный фермент (Cunningham et al., 1997). Будучи основной аконитазой для кишечной палочки во время экспоненциального роста, АГВ выполняет регуляторную роль. Так, при недостатке железа в среде или под воздействием окислительного стресса, железо-серные кластеры разрушаются, каталитическая активность теряется и в результате апо-белки связываются с определенными мРНК (Tang et al., 2004; Green, Paget, 2004). В зависимости от расположения сайтов связывания АГВ, такое взаимодействие повышает стабильность транскрипта или ингибирует трансляцию. Роль аконитазы в пост-транскрипционной регуляции исследована у высших организмов, где было показано, что цитоплазматические апо-аконитазы (цАГ, также известные как железо-регуляторный белок-1, IRP-1), обладают мРНК-связывающей активностью (Hentze, Kuhn, 1996; Aisen et al., 2001).

Tang Y. и сотрудники (Tang et al., 2005) показали, что АГВ *E. coli* формирует гомодимер *in vitro* и *in vivo*, и что переход мономер-димер зависит от наличия железа в среде. Заманчиво предположить, что железо-опосредованная реакция димеризации холо-АГВ может служить для модуляции каталитических свойств белка и скорости функционирования цикла лимонной кислоты. Таким образом, предполагается, что АГВ в мономерной и в димерной формах выполняют две различные функции: димер катализирует превращение цитрата в изоцитрат, а мономер выступает в качестве пост-транскрипционного регулятора.

Упрощенная схема, иллюстрирующая железо-опосредованное переключение АГВ *E. coli* между каталитической и мРНК-связывающей функциями, выглядит таким образом. При избытке железа в среде, оно воздействует на специфический сайт, который отличается от железо-серных кластеров АГВ, и формируются каталитически активные АГВ гомодимеры путем взаимодействия N-концевых областей субъединиц. Недостаток железа

фиксируется в N-концевой области, что приводит к потере железо–серного кластера. Потенциально важные интермедиаты, участвующие в формировании апо-АГВ, пока не охарактеризованы. Тем не менее, в условиях недостатка железа взаимодействие между субъединицами АГВ нарушается с образованием двух мономеров, которые способны распознавать и связывать специфические транскрипты (структура стебель–петля) через АГВ5-4 область. Таким образом, N-концевая область АГВ в составе домена 4 и домена 5 опосредует белок:белковые взаимодействие в присутствии железа и белок:мРНК взаимодействие в отсутствие железа, тем самым переключая АГВ между ее каталитической и регуляторной функциями (Tang et al., 2005).

Схожая картина функционирования аконитазы характерна и для таких прокариот как *B. subtilis* (Serio et al., 2006) и *Mycobacterium tuberculosis* (Banerjee et al., 2007). Классические бифункциональные аконитазы известны и у эукариот, железо-регуляторный белок 1 (IRP1) имеет цитозольную локализацию и реагирует на концентрацию железа в клетке, чередуя два функциональных состояния: ферментативно активной аконитазы, содержащей железо-серные кластеры и РНК-связывающий апопротеин, который действует как посттранскрипционный регулятор (Emery-Goodman et al., 1993). Тогда как митохондриальный белок играет важную роль в цикле трикарбоновых кислот и, следовательно, производстве энергии внутри клетки (Regev-Rudzki et al., 2005).

Печтер К.Б. (Pechter et al., 2013) с соавторами обнаружили, что аконитатгидратаза *B. subtilis* участвует в регуляции трикарбоновой ветви ЦТК (рис. 4).

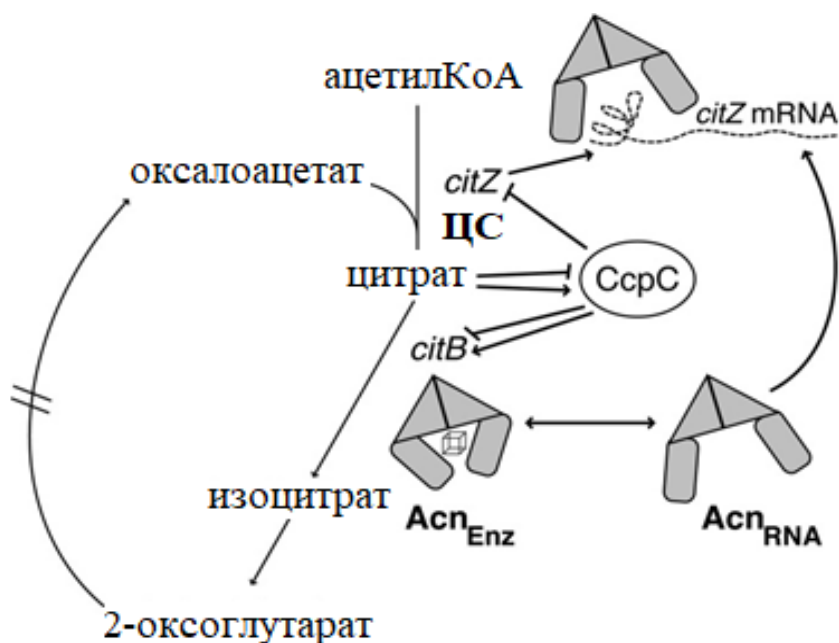


Рис. 4. Модель многоуровневой регуляции ЦТК у *Bacillus subtilis*.

На уровне транскрипции ген *citZ*, кодирующий цитратсинтазу (ЦС), репрессируется регуляторным белком СсрА (не показано), который активируется при высоком уровне глюкозы. Кроме того, и *citZ* и *citB* (ответственный за синтез аконитатгидратазы) были репрессированы регуляторным белком СсрС, который активен при отсутствии цитрата. Когда глюкоза расходуется, СсрА инактивируется, а активность *citZ* частично восстанавливается, в результате чего образуется небольшое количество цитрата. Образовавшаяся лимонная кислота влияет на СсрС, и активность *citZ* снижается, однако, для *citB* СсрС становится положительным регулятором, приводя к увеличению скорости функционирования аконитатгидратазы. Аконитаза в клетке присутствует в двух формах: ферментативная форма (Acn_{Enz}) и РНК-связывающая форма (Acn_{RNA}). РНК-связывающая форма АГ взаимодействует с мРНК *citZ* на посттранскрипционном уровне и снижает ее стабильность (пунктирная линия), что приводит к подавлению активности цитратсинтазы и продукции цитрата в клетке. Таким образом, клетка использует цитрат-

метаболизирующий фермент, аконитазу, чтобы жестко контролировать уровень цитрата в клетке, регулируя активность обоих ферментов, которые производят цитрат, цитрат-синтазу и аконитазу.

Помимо этого, для *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, было показано, что аконитаза косвенно модулирует синтез жгутиков путем взаимодействия с транскриптом *ftshH* протеазы (Tang et al., 2004). Аконитаза *Bacillus subtilis* (CitB) связывается с транскриптом *gerE* – гена, участвующего в споруляции (Serio et al., 2006). Аконитаза А *Streptomyces viridochromogenes Tu494* связывается с мРНК рекомбиназы А (*recA*) и *ftsZ*, геном деления клеток, участвующих в споруляции, а также несколько дополнительных функций для АГА были выявлены в *S. viridochromogenes Tu494* при воздействии на клетки окислительного стресса. Кроме того, аконитатгидратаза *Mycobacterium tuberculosis* связывается с транскриптом тиоредоксина (*trx*) и с *ideR*, железозависимым регулятором (Banerjee et al., 2007). Аконитатгидратазы А и В *Escherichia coli* (также являются РНК-связывающими белками) ауторегулируются на уровне синтеза белков и участвуют в ответе на окислительный стресс (Tang et al., 2002). Аконитатгидратаза катализирует обратимое взаимопревращение цитрата, цис-аконитата и D-изоцитрата. У эукариотических организмов данный фермент работает в митохондриях и цитозоле. Епринцев А.Т. с соавторами (Eprintsev et al., 2015) изолировали и очистили обе формы. Цитозольная АГ имела более высокий рН-оптимум (8.0), обладала в два раза большим сродством к цитрату (K_m 9,5 мМ) и более низким сродством к d,l-изоцитрату (K_m 1,7 мМ) по сравнению с митохондриальной формой (оптимум рН 7,5, K_m по цитрату - 21 мМ и по изоцитрату - 1,5 мМ). Митохондриальная аконитаза сильнее ингибируется H_2O_2 (скорость реакции снижается на половину при концентрации ингибитора 35 мкМ), чем цитозольная (60 мкМ). Предполагается, что митохондриальная форма работает в цикле трикарбоновых кислот, в то время как цитозольная участвует в реакциях глиоксилатного пути вне глиоксисом. Некоторые бактерии, такие как

Escherichia coli, имеют две изоформы АГ, АГА и АГВ, с разными физиологическими свойствами и экспрессионными профилями (Varghese et al., 2003), в то время такие прокариоты как *Bacillus* или *Xanthomonas* (Wilson et al., 1998) имеют только одну форму фермента. Аконитаза *Bacillus* участвует в связывании IRE-подобных последовательностей и, следовательно, проявляет свойства IRP (Alén, Sonenshein, 1999). Энергетический цикл *M. tuberculosis* имеет отдельные ветви окислительного и восстановительного цикла (Tian et al., 2005).

Эксклюзионная хроматография с последующей биохимической характеристикой элюированных фракций позволила выявить некоторые интересные особенности аконитазы *M. tuberculosis*. Хотя, подобно мономерным белкам аконитазного семейства, функциональная тримерная форма неизменно присутствовала при гель-фильтрации, вполне вероятно, что АГ *M. tuberculosis* существует в виде мономера (Banerjee et al., 2007). Аконитатгидратаза *M. tuberculosis* проявляет активность в достаточно широком диапазоне значений pH (от 7 до 10). Схожие результаты были получены при анализе активности изолированной АГ *E. coli* (Jordan et al., 1999). Так как *M. tuberculosis* приходится выживать в очень тяжелых условиях внутри человеческих макрофагов, вполне логично, что энергия ферментов ЦТК будет иметь широкий диапазон толерантности (Banerjee et al., 2005).

Аконитаза термоацидофильных архей *Acidocaldarius sulfolobus* была изолирована вместе с изоцитратлиазой. Данные белки были разделены денатурирующим гель-электрофорезом с кажущейся молекулярной массой 96 кДа для аконитазы и 46 кДа для изоцитратлиазы. Максимальная ферментативная активность проявлялась при pH 7.4 и температуре 75⁰С, Интересно, что аконитаза была достаточно активна даже при температуре 95⁰С (период полураспада около 14 мин). Значения K_m для трех субстратов цис-аконитата, цитрата и изоцитрата составили 108 мкМ, 2,9 мМ и 370 мкМ, соответственно. Ферментная реакция ингибируется типичными

ингибиторами флюороцитратом, транс-аконитатом и трикарболлиатом. Аминокислотные последовательности из трех внутренних пептидов аконитазы *C. acidocaldarius* показывают наличие высоко консервативных остатков гомологичных предполагаемым или известным эукариотическим, архейным и бактериальным последовательностям. Выделенный фермент содержал [3Fe--4C]-кластеры (Uhrigshardt et al., 2001).

1.5. Молекулярные аспекты функционирования ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла

СДГ катализирует окисление сукцината до фумарата и передает электроны на убихинон аэробной дыхательной цепи. Это уникальный фермент ЦТК, так как только он является мембраносвязанным (Altinok et al., 2015). СДГ кодируется кластером *sdhCDAB*. Два встроенных мембранных полипептида, кодируемых *sdhC* и *sdhD*, взаимодействуют с убихиноном, а остальные гены - *sdhA* и *sdhB* ответственны за синтез флавопротеина и железо-серного белка, соответственно (Cecchini et al., 2002; Yankovskaya et al., 2003). Большинство микобактериальных геномов включают две аннотированных сукцинатдегидрогеназы, обозначаемых как *Sdh1* и *Sdh2* (Berney, Cook, 2010). Окисление сукцината до фумарата ($E^{\circ} = +30$ мВ) и восстановление убихинона до убихинола ($E^{\circ} = +113$ мВ) является термодинамически выгодной реакцией ($\Delta G^{\circ} = -15$ кДж/моль). У микобактерий, окисление сукцината до фумарата ($E^{\circ} = +30$ мВ) сочетается с восстановлением менахинона MQN_2 ($E^{\circ} = -74$ мВ), эндэргонической реакцией при стандартных условиях ($\Delta G^{\circ} = +21$ кДж/моль) (Thauer et al., 1977). В геноме *M. smegmatis*, присутствуют два предположительных оперона сукцинатдегидрогеназы (рис. 5), *Sdh1* (MSMEG_0416-MSMEG_0420) и *Sdh2* (MSMEG_1672-MSMEG_1669) (Berney, Cook, 2010). Эти опероны СДГ *M. smegmatis* являются гомологичными двум аннотированным оперонам

СДГ *M. tuberculosis* - *Sdh1* (Rv0249c-Rv0247c) и *Sdh2* (Rv3316-Rv3319) (Pecsi et al., 2014).

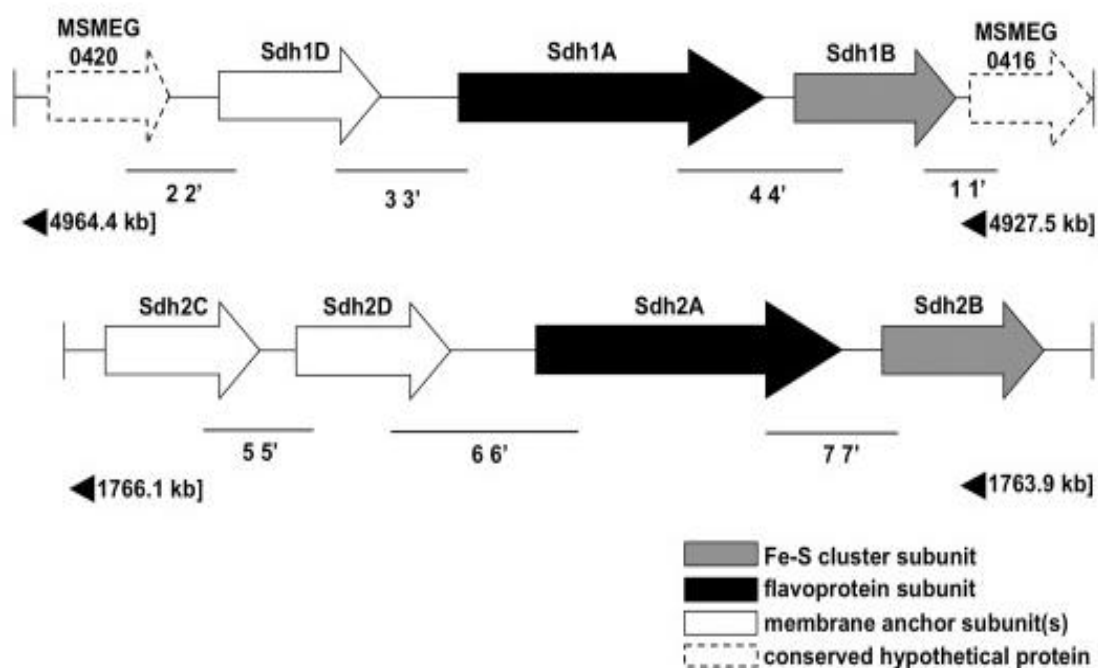


Рис. 5. Схематическое изображение *sdh1* (MSMEG_0416-MSMEG_0420) и *sdh2* (MSMEG_1672-MSMEG_1669; *sdh2C*-*sdh2B*) генных кластеров, в том числе прогнозируемые функции каждой субъединицы (Verney, Cook, 2010).

На основе анализа мембраносвязанного домена (субъединицы С или субъединиц С и D) и содержания гема, сукцинатдегидрогеназы могут быть разделены на пять разных типов (Lancaster, 2001). Согласно этой классификации, *sdh2*, с двумя группами гема и двумя небольшими гидрофобными субъединицами (субъединицы С и D), может быть классифицирована как тип А, к которому относятся некоторые экстремофилы (Schäfer et al., 2002). *Sdh1*, с большой одиночной гидрофобной субъединицей (*sdh1D*), может быть классифицирована как фермент типа В. Ферменты данного типа обнаруживаются в самых разнообразных микроорганизмах

(Lancaster, 2013). Исследование генома *Corynebacterium glutamicum* показало, что белок, кодируемый геном *sdhA*, не только выполняет роль фермента ЦТК, но и связан с серным метаболизмом, тем самым регулируя активность генов, участвующих в редокс-гомеостазе (Lee et al., 2014). Паралог СДГ у *E. coli* - фумаратредуктаза (FrdABCD, Фрд) не содержит гема и катализирует восстановление фумарата в сукцинат. Однако сверхэкспрессия FrdABCD может катализировать активность сукцинат:убихинон оксидоредуктазы достаточную, чтобы восполнить недостаток СДГ (Maklashina et al., 1998). В геноме *E. coli* гены сукцинатдегидрогеназы (*sdhCDAB*) находятся в хромосоме возле генов двух других ферментов ЦТК – 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (*sucABCD*) и цитрат-синтазы (*gltA*). *SdhCDAB* активно экспрессируется в ходе аэробного роста клеток. Экспрессия оперона существенно снижается, когда клетки переходят на анаэробный тип питания (Shen, Gunsalus, 1997). Отрицательный контроль происходит по механизму репрессии из-за связывания AgcA промотором (Iuchi et al., 1994). Оперон СДГ также находится под катаболитным контролем, экспрессия генов менялась при аэробном росте клеток с различными соединениями (Park et al., 1995). Однако недавно было показано, что анаэробная экспрессия оперона *sdhCDAB-sucABCD* (кодирующего сукцинатдегидрогеназу, α -кетоглутаратдегидрогеназу и сукцинил-КоА-синтазу) осуществляется для включения анаэробно функционирующего ЦТК с теоретическим образованием 10 эквивалентов НАД(Ф)Н при утилизации глюкозы. Эти восстановленные эквиваленты могут быть окислены посредством синтетического дыхания (synthetic respiration) при восстановлении ксилозы с образованием ксилитола (Iverson et al., 2016). Изоцитратлиаза конкурирует с ферментом ЦТК изоцитратдегидрогеназой за общий субстрат - изоцитрат. Путем изменения суммарной клеточной активности обоих ферментов и/или путем изменения их сродства к изоцитрату достигается контроль углеродного потока между двумя циклами (LaPorte et al., 1985). Рост кишечной палочки на ацетате приводит к

снижению активности НАДФ⁺-зависимой изоцитратдегидрогеназы, вызванному ее обратимым фосфорилированием. Соответствующая киназа изоцитратдегидрогеназы кодируется в том же опероне, что и изоцитратлиаза и малат-синтаза. Снижение активности изоцитратдегидрогеназы перенаправляет изоцитрат в глиоксилатный цикл благодаря активности изоцитратлиазы (LaPorte et al., 1985). В геноме *M. tuberculosis* несколько генов были аннотированы как нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, участвующие в активации ацетата и в глиоксилатном цикле, в том числе и Rv0467, или *icl1*, и Rv1915/1916 - *icl2*, кодирующий две микобактериальные изоцитратлиазы (Micklinghoff et al., 2009). N-терминальная последовательность белка (50 кДа) *M. avium* соответствует последовательности из 428 аминокислот, обнаруженной в базах данных генома микобактерий (Sanger Center, TIGR). Данный белок содержит открытую рамку считывания (ОРС, Rv0467, названную *icl*) и проявляет максимальное сходство с изоцитратлиазой из *Corynebacterium glutamicum* и из *Rhodococcus fascians* с идентичностью к последовательности *M. tuberculosis* 79 и 80% соответственно (Reinscheid et al., 1994; Vereecke et al., 1994). Данные организмы, а также микобактерии, относятся к актиномицетам, и высокое сходство между эквивалентными белками из этих групп не является необычным (Jäger et al., 1996). Интересно, что микобактериальные базы данных содержат еще одну открытую рамку считывания (*aceA*), которая показывает небольшую гомологию изоцитратлиазы *E. coli* (35%). У штамма H37Rv эта ОРС содержит два гена, *aceAa* (Rv1915) и *aceAb* (Rv1916), которые перекрывают друг друга на один нуклеотид на 3' - конце *aceAa* и 5' конце *aceAb*. Однако в *M. tuberculosis* CSU93 *aceA* представляется одной ОРС (Höner et al., 1999). Секвенирование геномов *M. avium*, *M. tuberculosis* и *M. leprae* позволило выявить открытые рамки считывания, и *icl* и *aceA* существуют как два различных гена во всех этих штаммах, с идентичностью последовательности 80% между видами (Höner et al., 1999). Регуляторный механизм или регуляторные белки,

которые контролируют экспрессию *icl1* в *M. tuberculosis*, малоизучены. Тогда как регулирование ИЦЛ и МС *C. glutamicum* (генов, аннотированных как *aceA* и *aceB*, соответственно) интенсивно изучается (Gerstmeir et al., 2003). Ген *aceA* *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, кодирующий белок, который на 72% идентичен изоцитратлиазае *Colwellia maris*, но менее чем на 30% идентичен их гомологам из псевдомонад (Díaz-Pérez et al., 2007). J.A. Ramírez-Trujillo с соавторами (Ramírez-Trujillo et al., 2007) показали, что *aceA* является одним из основных генов, отвечающих за метаболизм ацетата у *S. meliloti*. Полученные ими результаты свидетельствуют о том, что для *Rhizobium*, а также для других бактериальных видов, *aceA* является обязательным в работе глиоксилатного цикла, поскольку мутации в этом гене полностью блокируют рост на ацетате. При росте *Escherichia coli* на ацетате активируется глиоксилатный цикл. Гены метаболических и регуляторных белков, функционирующих в данном пути, объединены в оперон. Изоцитратлиаза и малатсинтаза кодируются генами *aceA* и *aceB*; ИДГ киназа/фосфатаза кодируется геном *aceK* (Sunnarborg, 1990). Транскрипция оперона *aceBAK* и гена *iclR*, регулирующего скорость работы ИЦЛ, начинается с одной точки старта. Центр связывания IclR находится в положении -38 п.н. от *aceB* промотора и -8.5 п.н. от промотора *iclR* (Gui et al., 1996). Транскрипция гена *iclR in vivo* начинается от одного промотора (*iclRP*) (рис. 6). Продукт данного гена связывается со своим собственным промотором и репрессирует транскрипцию в аутогенной манере.

AceB оперон содержит три гена, *aceB*, *aceA* и *aceK*, а *iclR* оперон состоит из двух генов, *iclR* и *arp*.

Эти два смежных оперона транскрибируются в противоположных направлениях и находятся под контролем IclR репрессора. Сайт связывания IclR (IclR box) расположен недалеко от промоторов обоих оперонов (Yamamoto, Ishihama, 2003). Негре с соавторами (Negre et al., 1997), показали, что транскрипция промотора *aceB* заметно снижается, когда использовались

мутантные RNAP, содержащие $\alpha 235$, с делецией в С-концевой области 84 остатков.

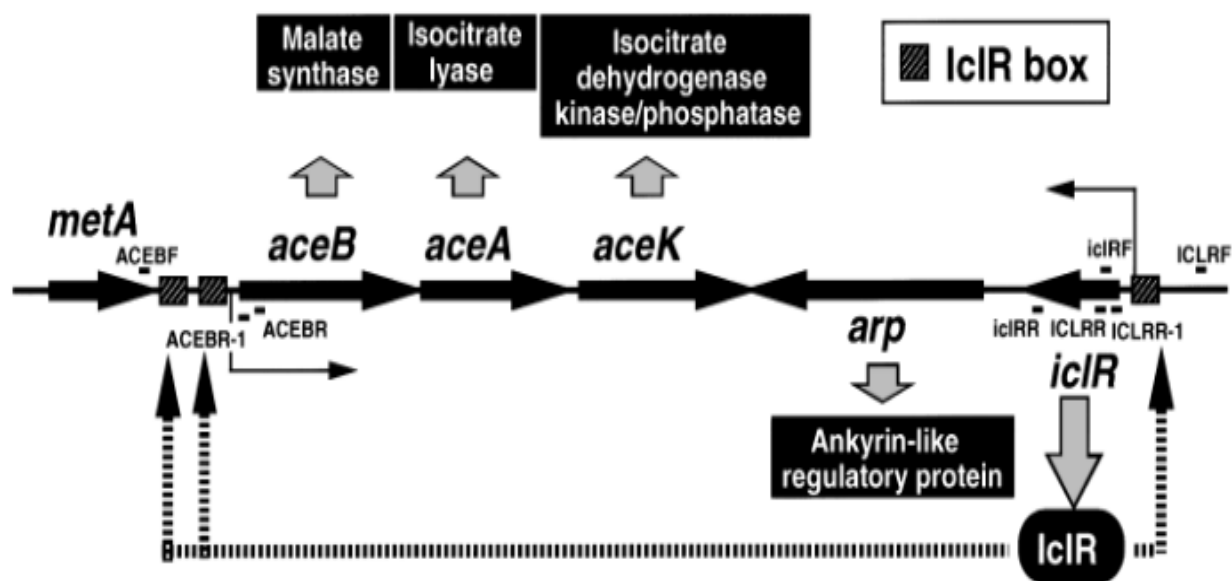


Рис. 6. Транскрипционная организация оперонов *aceB* и *iclR*.

Данный факт предполагает наличие UP элемента в составе *aceB* промотора, который распознается как α CTD. В геноме дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* обнаружены два гена, которые кодируют аконитатгидратазу; *aco1+* (SPAC24C9.06с), ответственный за синтез только аконитазного домена, и *aco2+* (SPBP4H10.15), кодирующий аконитазный домен, связанный с митохондриальным рибосомальным белком L21 (Mrp149) бактериального происхождения. Причем оба этих гена необходимы для жизнеспособности клеток (Kim et al., 2010; Hayles et al., 2013). Белок Aco1 (789 аминокислотных остатков) на 77% гомологичен единственному домену аконитазы, охватывающему аминокислотные остатки от 52 до 778, Aco1 *S. cerevisiae*. По оценкам, от 40 000 (Marguerat et al., 2012) до 100 000 молекул Aco1 присутствуют в клетках дрожжей на протяжении клеточного цикла, митоза и вегетативного роста (Carpy et al., 2014).

Белок Aco2 (912 аминокислотных остатков) имеет аконитазный домен (44-805) и домен bL21 (806-912), на 70 и 42% гомологичных Aco2 и bL21

дрожжей *S. cerevisiae*, соответственно. Aco2 локализован в митохондриях, что было продемонстрировано с помощью полногеномных исследований (Matsuyama et al., 2006). Анализ последовательностей *aco1* и *aco2* *S. pombe* показал, что оба гена содержат митохондриально-нацеленную последовательность (MTS) на N-конце, в то время как *aco2* имеет сигнал ядерной локализации (NLS) вблизи С-конца. Многие виды бактерий также обладают двумя генетически различными белками аконитатгидратазы, AcoA и AcoB.

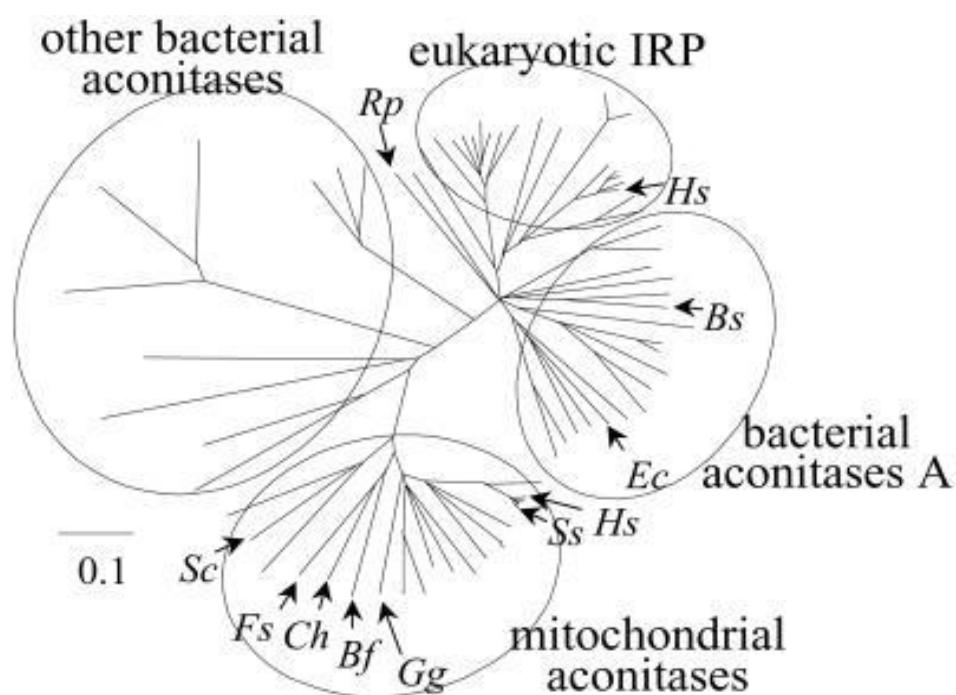


Рис. 7. Филогенетическое дерево аконитазы и IRP бактерий и эукариот (Baughn, Malamy, 2002). *Rp*, *R. prowazekii*; *Hs*, *H. sapiens*; *Bs*, *B. subtilis*; *Ec*, *E. coli*; *Ss*, *S. scrofa*; *Gg*, *G. gracilis*; *Bf*, *B. fragilis*; *Ch*, *C. hutchinsonii*; *Fs*, *F. succinogenes*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Современные представления о регуляции и функционировании бактериальных AcoA и AcoB основываются на модели, разработанной для *E. coli*. Для *Salmonella enterica serovar Typhimurium* также характерно наличие

двух аконитатгидратазных генов (Baothman et al., 2013), тогда как *Helicobacter pylori* обладает одной копией гена аконитазы, *asnB* продукт которого, как известно, проявляет аконитазную активность в цикле трикарбоновых кислот (Pitson et al., 1999; Austin, Maier, 2013). Множественное выравнивание последовательностей аконитаз *Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides* (CFB) группы бактерий, митохондриальных аконитаз, IRP-АГ и других бактериальных аконитатгидратаз было использовано для реконструкции филогенетического дерева (рис. 7). Из этого анализа ясно, что CFB аконитазы относятся к группе митохондриальных аконитаз.

Интересно, что α -протобактерии *Rickettsia prowazekii*, которые считаются близким предком митохондрий (Karlberg et al., 2000), кодируют фермент, который попадает в бактериальную подгруппу IRP-аконитазной группы (Kurland, Andersson, 2000). Эти наблюдения свидетельствуют о том, что гены, кодирующие митохондриальные и CFB формы фермента, происходят от общего предка, далекого от того, который породил цитозольные и бактериальные аконитазы.

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1.1. Объекты исследования

В работе использовали штаммы Д-501, Д-507 и Д-380, выделенные из микробных сообществ нитчатых сероокисляющих бактерий из умеренно термального сульфидного источника «Петушок» (г. Горячий Ключ Краснодарского края).

2.1.2. Состав питательных сред

Для культивирования использовали измененную среду Армбрустера следующего состава: K_2HPO_4 – 21,5 мг; KH_2PO_4 – 8,5 мг; Na_2HPO_4 – 34,4 мг; $NH_4Cl \cdot 7 H_2O$ – 300 мг; $CaCl_2$ – 27,5 мг; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 22,5 мг; $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ 0,25 мг; вода дистиллированная – 1 л (Armbruster, 1969).

В среду перед посевом вносили набор витаминов и микроэлементов (Pfennig, Lippert, 1966), рН среды перед посевом доводили до 7.2 – 7.5. В среду для выделения перед посевом вносили также лактат – 100 мг/л; тиосульфат натрия – 1г/л. Твердая среда для изоляции колоний имела тот же состав с добавлением агара 20 г/л. Для посева использовали отмытые многократно в стерильной водопроводной воде бактериальные нити. Для получения накопительной культуры использовали полужидкую среду того же состава, которую получали добавлением агара в концентрации 2 г/л.

Также при хемогетеротрофном культивировании перед посевом вносили 500 мг/л пептона, при миксотрофном - 500 мг/л пептона, 1г/л тиосульфата натрия. Инкубировали при температуре 27°C. Интервал между посевами составлял 2-3 суток.

2.1.3. Микроаэробное культивирование

Микроаэробное культивирование осуществлялось во флаконах объёмом 0,5 л с резиновыми пробками и завинчивающимися крышками. Перед посевом стерильные флаконы заполняли доверху свежeproкипячёной средой, а затем продували аргоном, оставляя необходимый для посева объём среды -100 мл. Во флаконы вносили требуемое для постановки опыта количество воздуха (табл. 1). Концентрация кислорода в газовой фазе в итоге составляла 3,5%. Затем вносили 1 мл на 100 мл среды инокулята бактерий (Грабович, 2005).

Таблица 1.

Содержание кислорода в газовой и жидкой фазах в зависимости от концентрации воздуха в газовой фазе

Процент воздуха в газовой фазе, %	100	17,5
Процент кислорода в газовой фазе	20	3,5
Концентрация растворенного O ₂ в среде	8,5-7,8	1,4-1

Соотношение объемов жидкой и газовой фаз составляло 1:5. В опытах стерилизация газовой фазы достигалась путем пропускания через бактериальные ультрафильтры (Millipore, 0,2 мкм).

2.1.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1.2.1. Получение клеточной суспензии и ферментных препаратов

Суспензию клеток получали путём центрифугирования культуры при 5000g и 4⁰С в течение 30 минут. Клетки отмывали 0,1 М Трис-НСl-буфером (рН 7.5) и осаждали при тех же режимах центрифугирования в течение 10 минут.

Для получения гомогената бактериальные клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т при мощности 500 Ватт и частоте 22кГц в течение 2 минут на ледяной бане. Супернатант получали после центрифугирования гомогената при 9000g и 4⁰С в течение 30 минут (Грабович и др., 1998; Grabovich et al., 1999).

Белок в клеточных экстрактах определяли методом Лоури (Lowry et al., 1951). Целые клетки предварительно подвергали щелочному гидролизу в 1N NaOH в течение 10 минут при 90⁰С.

2.1.2.2. Методы определения активности ферментов серного метаболизма

Определение ферментативной активности проводили в супернатанте из двухсуточной культуры в середине фазы экспоненциального роста. Активность тиосульфатдегидрогеназы (КФ 1.8.2.2) (Rolls, Lindstrom, 1967), сульфитоксидоредуктазы (КФ 1.8.3.1) (Петушкова, Ивановский, 1976) определяли спектрофотометрически в супернатанте по восстановлению феррицианида или по скорости восстановления цитохрома *c* в присутствии окисляемого субстрата. Спектрофотометрические исследования с использованием $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{3-}$ проводили при $\lambda=420$ нм, а цитохрома *c* - при $\lambda=550$ нм.

АФС-редуктазу (КФ 1.8.99.2) определяли в реакционной среде того же состава, что и для сульфитоксидазы, но с добавлением аденозинмонофосфата (АМФ – 1 мкмоль/л) (Peck et al., 1965).

2.1.2.3. Анализ неорганических соединений серы

Сероводород определяли колориметрически с использованием диметил-п-фенилендиамина. Раздельное определение $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$ при их совместном присутствии в среде проводили методом раздельного иодометрического титрования (Резников et al., 1970). SO_4^{2-} определяли хлоранлатным методом (Уильямс, 1982). Элементную серу определяли по методу Морриса (Morris et al., 1948) колориметрически на СФ -56.

Элементную серу внутри клеток идентифицировали по характерному светопреломлению в поляризационном микроскопе.

2.1.2.4. Определение активности ключевых ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла

2.1.2.4.1. Определение активности сукцинатдегидрогеназы

Активность СДГ определяли в бактериях *Sphaerotilus natans* штамм Д-507. Для этого культуры клеток разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2,5 мин в ледяной бане с последующим добавлением Тритона Х-100 4,02% (0,002% к объёму гомогената). Затем гомогенат центрифугировали при 3000g в течение 5 мин. Супернатант использовали для выделения мембранной фракции путем центрифугирования при 12000g в течение 15 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 2 мл 10 мМ Трис–НСl-буфера, рН 7.8, содержавшего 2 мМ сукцината натрия и 0.01% Тритона Х-100, и использовали для измерения активности фермента.

Активность СДГ определяли методом, основанным на применении искусственных акцепторов электронов с соответствующим редокс-потенциалом (Cooper, Beevers, 1969). Среда определения представляла собой 30 мМ фосфатный буфер (рН 7.8), содержащий 1 мМ феназинметасульфат (ФМС), 0.08 мМ дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ), 2 мМ азид натрия и 20 мМ сукцинат натрия.

Активность фермента рассчитывали по падению оптической плотности среды при длине волны 600 нм в течение 5 мин при 25 °С, обусловленному обесцвечиванием ДХФИФ в ходе его восстановления. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, образующего 1 мкмоль продукта за 1 мин при 25°С.

2.1.2.4.2. Определение активности аконитатгидратазы

Интенсивность функционирования аконитатгидратазы (КФ 4.2.1.3) измеряли при длине волны 240 нм в среде калориметрирования следующего состава: 50 мМ трис-НСl, рН – 8,0; цитрат Na 30 мМ (Землянухин А.А., Землянухин Л.А., 1996).

2.1.2.4.3. Определение активности изоцитратлиазы

Определение активности изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1) проводили, учитывая разницу экстинкции при $\lambda = 324$ нм комплекса, образующегося после взаимодействия фенилгидразина, присутствующего в реакционной среде, и глиоксилата, образующегося в ходе ферментативной реакции, в среде инкубирования следующего состава: 100 мМ трис-НСl, рН 7,5; MgCl₂·6H₂O 5 мМ; ЭДТА 0,08 мМ; ДТТ 5 мМ; изоцитрат натрия 3мМ; фенилгидразин НСl (Kornberg, Krebs , 1957).

2.1.2.5. Определение количества белка

Общее количество белка определяли по методу Лоури с соавт. (Lowry et al., 1951). Оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре при 750 нм. Содержание белка рассчитывали по формуле:

$$B = \Delta D \cdot K \cdot V_{\text{общ}} / V_{\text{внес}},$$

ΔD – оптическая плотность;

K – пересчетный коэффициент;

$V_{\text{общ}}$ – общий объем раствора, мл;

$V_{\text{внес}}$ – объем взятой на белок пробы, мл.

Удельная активность выражается в ферментативных единицах на мг белка:

$$U_{\text{д.акт}} = E/B.$$

После выхода фермента с колонки с ДЭАЭ-фрактогелем содержание белка определяли спектрофотометрически (Мешкова, Северин, 1979), используя формулу:

$$B = 1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}$$

A_{280} и A_{260} – поглощение раствора при длинах волн соответственно 280 и 260 нм.

2.1.2.6. Проведение электрофоретических исследований

2.1.2.6.1. Аналитический электрофорез

Для изучения электрофоретической подвижности и выявления множественных молекулярных форм СДГ в различных бактериальных объектах проводили разделение с помощью электрофореза в

полиакриламидном геле. При проведении электрофореза использовали метод Дэвиса и Орнштейна (Ornstein, Davis, 1964).

Для концентрирования белкового раствора использовали крупнопористый концентрирующий полиакриламидный гель (2 %). Разделение осуществляли на мелкопористом разделяющем геле, содержащем 7,5% полиакриламида. Растворы мелко- и крупнопористого гелей готовили, как описано у Мауэра (Maуer, 1971). После окончания процесса полимеризации наносили исследуемые пробы. На один карман пластинки геля наносили не больше 25-30 мкг (0,04 мл) исследуемого образца вместе с 40 % раствором сахарозы, который является антиконвекционной средой. Для контроля за движением фронта в пробу вносили 0,1 % раствор бромфенолового синего. Разделение исследуемых белков проводили в основной буферной системе с рН-8,3. Электрофоретическое разделение белков проводили при температуре 2–4°С. Подавали постоянный электрический ток 1–2 мА на один карман пластинки геля. Электрофорез продолжался, как правило, 2–2,5 часа. Окончание электрофореза определяли по достижению индикаторной краской (бромфеноловый синий) конца нижнего геля.

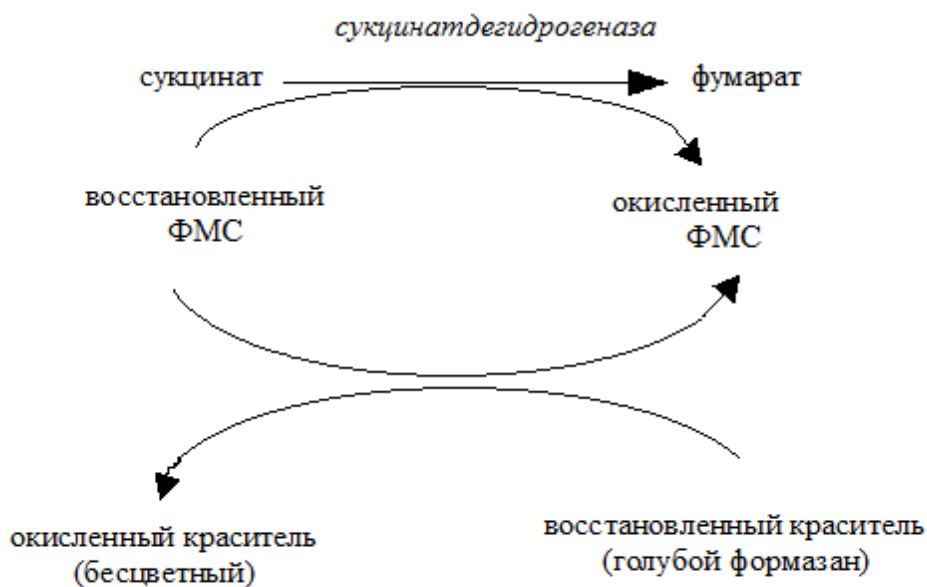
2.1.2.6.2. Специфическое проявление сукцинатдегидрогеназы, изоцитратлиазы и аконитатгидратазы

Специфическое проявление сукцинатдегидрогеназы

Специфическое проявление сукцинатдегидрогеназы осуществляли тетразолиевым методом (Гааль и др., 1982).

Четко локализующийся в месте образования диформаза указывал на положение СДГ в пластинке геля. При этом гели инкубировали в темноте при 37°С в среде, содержащей калий-фосфатный буфер 0,1 М (рН 7,5), 0,1 М

сукцинат натрия, 0,5 мг/мл нитросинего тетразолия и 1 мг/мл феназинметасульфата (Гааль и др., 1982).



Специфическое проявление изоцитратлиазы

Методика основана на способности взаимодействия глиоксилата и модифицированного реагента Шиффа, в результате чего образуется окрашенное соединение, которое стабильно, достаточно специфично и не сразу диффундирует в гель (Reeves, Volk, 1972).

Гели окрашивали путём помещения их в инкубационную среду следующего состава: 50 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5; 1 мМ ЭДТА; 3 мМ MgCl₂·6H₂O; 3 мМ ДТТ; 10 мМ изоцитрат (трёхнатриевая соль); 1,2 мл модифицированного реагента Шиффа. Гель инкубировали при 37 °С до появления ярко-красной полосы в месте локализации ИЦЛ.

Специфическое проявление аконитатгидратазы

Для специфической идентификации АГ использовали тетразолиевый метод. Данный метод успешно применяется для выявления неокислительных ферментов, таких как аконитаза, каталитическая активность которых определяется с использованием NADP^+ -зависимой изоцитратдегидрогеназы в качестве вспомогательного фермента. Под действием NADP^+ -зависимой изоцитратдегидрогеназы в присутствии субстрата происходит восстановление NADP^+ . При участии феназинметасульфата (который выполняет роль вспомогательного переносчика) водород затем переносится на нитросиний тетразолий. Краситель в окисленном состоянии имеет желтую окраску и хорошо растворим в воде. Его восстановленная форма (диформазан) практически нерастворима в воде и окрашена в фиолетовый цвет. Восстановленная форма красителя сорбируется на той белковой фракции в геле, на которой произошло восстановление NADP^+ (Епринцев, Климова, 2008). Для специфической идентификации АГ использовалась среда проявления следующего состава: 50мМ Tris-HCl-буфер, pH 8,0; 20мМ цис-аконитовая кислота; 2мМ MgCl_2 ; 1ФЕ NADP^+ -изоцитратдегидрогеназы; 1мМ NADP^+ ; 3,3мМ PMS; 0,5мг на 1мл данной среды NTB. Инкубация проводилась в темноте при 37 °С. Гели с проявившимися в местах локализации АГ полосами хранили в среде фиксации: смесь этанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 10:1:30.

2.1.2.7.Методика получения высокоочищенных препаратов изоформ аконитатгидратазы и сукцинатдегидрогеназы

Очистку сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы проводили, используя следующую схему.

1. Гомогенизация материала.
2. Гель-фильтрация ферментных препаратов на колонке с сефадексом G-25 для освобождения их от низкомолекулярных примесей.

3. Ионообменная хроматография на колонке с ДЭАЭ-Sephacel.

Десорбцию изоформ осуществляли с помощью линейного градиента KCl.

2.1.2.7.1.Очистка аконитатгидратазы

Для осуществления разделения изоформ аконитатгидратазы использовалась трехстадийная схема очистки. Все стадии осуществляли при температуре 0 - +4 °С. Клеточные экстракты (гомогенат) получали методом ультразвукового разрушения на дезинтеграторе УЗДН-2Т (мощность 500 Вт, частота 22 кГц). Воздействие ультразвуком проводилось в течение 2-х минут в ледяной бане. Гель-фильтрацию осуществляли на колонке с сефадексом G-25 (размер колонки 2 x 25 см). Для определения свободного объема через готовую колонку пропускали 2 мл 0,2 %-ного раствора голубого декстрана 2000. Обессоливание белковых растворов осуществляли гель-фильтрацией, при этом элюцию проводили теми же буферными системами, в которых растворяли осадок. Обессоленный раствор фермента наносили на колонку с ДЭАЭ-Sephacel (1,5 x 15 см). Элюцию аконитазной активности осуществляли линейным градиентом от 50 mM до 120 mM KCl в 50 mM трис-HCl-буфере, pH 8,0.

2.1.2.7.2.Разделение и очистка изоформ сукцинатдегидрогеназы

После ультразвукового разрушения у бактериальных клеток (условия описаны в предыдущей подглаве) получали гомогенат, который подвергался центрифугированию в течение 5 минут при 3000g при температуре 0 - +4 °С. Полученный супернатант подвергался гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25, после чего получали ферментный раствор без низкомолекулярных соединений. Для разделения изоформ сукцинатдегидрогеназы использовали ионообменник ДЭАЭ-Sephacel.

Десорбцию сукцинатдегидрогеназной активности осуществляли с помощью линейного градиента от 60 до 100 мМ КСl в 50 мМ трис-НСl-буфере. Фракции собирали по 2 мл и определяли в них активность исследуемого фермента.

2.1.2.8. Исследование кинетических характеристик и регуляции активности изоформ ферментов

Кинетические свойства изоформ ферментов изучали на высокоочищенных препаратах. Определение констант Михаэлиса осуществляли с использованием программ линейной аппроксимации по методу наименьших квадратов методом Лайнуивера-Берка (Диксон, Уэбб, 1982; Келети, 1990; Варфоломеев, Гуревич, 1999). Влияние рН на скорость ферментативной реакции определяли путем проведения серии измерений скорости ферментативной реакции при различных значениях рН.

2.1.2.9. Молекулярно-биологические методы идентификации генов и исследование их экспрессии (СДГ, АГ и ИЦЛ)

2.1.2.9.1. Выделение суммарной клеточной РНК

Для выделения суммарной клеточной РНК использовался специальный реагент ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя. ExtractRNA - монофазный водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата, предназначенный для быстрого выделения суммарной РНК высокого качества из широкого круга объектов: животные и растительные ткани, культуры клеток млекопитающих, бактерий, дрожжей.

Добавленный к образцу реагент моментально лизирует клетки, при этом целостность РНК сохраняется за счет высокоэффективного ингибирования активности РНКаз. В процессе денатурации все клеточные

компоненты переходят в гомогенат, а затем, после добавления хлороформа и последующего центрифугирования, эмульсия разделяется на водную фазу, интерфазу и органическую фазу, при этом РНК, ДНК и белки оказываются в разных фазах.

Суммарная РНК, выделенная с помощью реагента ExtractRNA, может быть использована для синтеза кДНК, ОТ-ПЦР, Нозерн блота, *in vitro* трансляции, выделения поли (А)⁺ фракции и других приложений.

2.1.2.9.2. Определение концентрации суммарной клеточной РНК

Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически на T70+ UV-VIS Spectrophotometer (PG Instruments Limited, Англия). Измерение поглощения при 260 и 280 нм проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Значение концентрации РНК в исходном растворе (мкг/мкл) находили, используя формулу (<http://www.molbiol.ru/appendix.html>):

$$C = (62,9 \cdot A_{260} - 36 \cdot A_{280}) \cdot P, \text{ где}$$

C – концентрация РНК в растворе (мкг/мл);

A_{260} – значение поглощения при длине волны 260 нм;

A_{280} – значение поглощения при длине волны 280 нм;

P – разбавление исходного раствора РНК.

2.1.2.9.3. Получение кДНК методом обратной транскрипции

Для получения кДНК использовали реакцию обратной транскрипции с выделенной суммарной РНК. Обратная транскрипция РНК осуществлялась с использованием набора реактивов MULV RT kit (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя. В качестве затравочного использовали олиго-

dT праймер. Присутствие в реакционной среде IRNasine позволяет избежать деградации матриц РНК во время протекания реакции.

2.1.2.9.4. Аналитический электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Для визуализации и анализа качества выделенной РНК использовался электрофорез в агарозном геле (Епринцев и др., 2008; Попов и др., 2006). Нуклеиновые кислоты разделяли в 1% геле агарозы Helicon, Россия. Размер геля составлял 10 × 12 см.

Визуализация результатов проводилась с использованием трансиллюминатора с длиной волны 312 нм. Результаты фиксировались системой фото-видео документирования DNA Analyzer (ДНК-технология, Россия) и обрабатывались с помощью программы Gel Explorer 1.0.

2.1.2.9.5. Подбор специфических праймеров

Подбор праймеров осуществляли на основе нуклеотидных последовательностей генов *sdh* (WP_037482627.1), *icl* (WP_037483029.1) и *aco* (SIQ43228.1) из *S.natans*, найденных в международной базе данных GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Праймеры к гену *sdh*:

прямой – TCCGCCAGCTATTCTGGTTC;

обратный – GAGCTCGTAGACGACCTTGG;

к гену *aco*:

прямой – GAGGGCTGTTATCTGGTGCG;

обратный – GGATCACCATGAAGGGCTCG;

к гену *icl*:

прямой – CTGGTACTTG TAGCCCAGCG;

обратный - GGTCTGGAGCAGTCGATCAG.

2.1.2.9.6. Проведение ПЦР в реальном времени

Для выяснения изменения уровня экспрессии генов, кодирующих сукцинатдегидрогеназу, изоцитратлиазу и аконитатгидратазу, проводили ПЦР-РВ на приборе Bio-Rad DNA Engine Thermal Cycler Chromo 4 (Bio-Rad, США), используя в качестве красителя SYBR Green I. С помощью данного метода можно оценить уровень экспрессии генов в условиях эксперимента по анализу содержания соответствующей РНК (Епринцев и др., 2008). Параметры амплификации: предварительная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 35 циклов: 95°C – 20 с, 59°C – 20 с, 72°C – 15 с, 72°C – 15 с (детекция) и, наконец, 72°C – 4 мин. Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации 16S РНК с ген-специфичными праймерами (прямой: tggtagtccacgcsctaаас; обратный: ccатgсagсacctgtctctа). При проведении 35 циклов амплификации с суммарной РНК, не прошедшей этапа обратной транскрипции, мы не наблюдали накопления ПЦР-продукта (отрицательный контроль). Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов проводили с применением $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen et al., 2001).

2.1.2.10. Статистическая обработка экспериментальных данных

Опыты проводили в трехкратной биологической и аналитической повторности. В таблицах и на рисунках приводятся данные типичных опытов, причем каждое значение есть среднее арифметическое из трех определений. Для определения достоверности результатов исследований применяли метод вариационной статистики. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов с помощью критерия Стьюдента. Из данных исследования (вариант x_i)

находили среднее арифметическое \bar{x} (M); затем вычисляли отклонения каждой варианты от среднего значения $(x_i - \bar{x})$, после чего рассчитывали квадраты отклонения варианты от среднего значения $(x_i - \bar{x})^2$, затем находили сумму квадратов отклонений $\sum (x_i - \bar{x})^2$. Далее вычисляли среднее квадратичное отклонение вариант от среднего арифметического (σ) для контроля и опыта по формуле:

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}, \quad \text{где } n - \text{ число вариантов.}$$

Затем находили ошибку данных контроля и опыта, после чего рассчитывали нормированное отклонение (t). Значение t, то есть оценка достоверности различий между контролем и опытом, сравнивалось по таблице распределения Стьюдента. Если вычисленное значение совпадает с табличным или больше его, то разница в эксперименте считалась достоверной. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p \leq 0,05$ (Лакин, 1990). Для построения графиков использовали данные, обработанные с помощью программ линейной и параболической аппроксимации.

2.3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.3.1. Трансформация серного метаболизма у штаммов

S. natans subsp. *sulfidivorans* Д-501 и Д-507 при разных условиях культивирования

2.3.1.1. Влияние аэробного режима культивирования бактерий штамма Д-501 на скорость и продукты окисления тиосульфата

Известно, что аэробный режим оказывает существенное влияние на трансформацию основных метаболических потоков в серобактериях (Гриднева и др., 2009). Для штамма *S. natans* subsp. *Sulfidivorans* Д-501 изменение обмена веществ, связанное с хемогетеротрофным типом питания, может быть вызвано только органическими веществами в питательной среде. В наших опытах по исследованию аэробного культивирования осуществляли контроль за трансформацией основного метаболизма по отличительным характеристикам окисления тиосульфата при аэробных и микроаэробных условиях.

Анализ полученных данных (рис.7) показывает важные отличительные особенности, связанные с окислением тиосульфата штаммом Д-501 в аэробных и микроаэробных условиях. У изучаемого штамма обнаружены значительные отличия по интенсивности данного процесса. В частности, микроорганизмы (в аэробных условиях) показывали в 2,5 раза меньшую скорость окисления тиосульфата по сравнению с бактериями, культивируемыми в микроаэробных условиях. Следует отметить, что в результате окисления образовывался тетратионат как конечный продукт. В то же время при микроаэробном культивировании окисление тиосульфата вызывало синтез до 90 мг/л серы сульфата. В микроаэробных условиях помимо сульфата, в незначительной степени происходило образование тетратионата (рис.8).

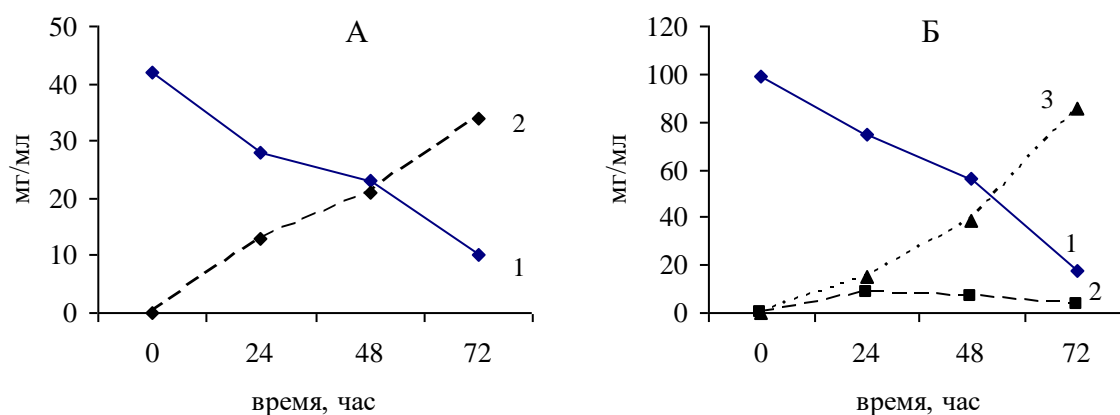


Рис. 8. Влияние кислорода в газовой фазе на изменение и продукты окисления тиосульфата у штамма Д-501

А - 20% O₂; Б – 5% O₂. 1 - S/S₂O₃²⁻; 2 - S/S₄O₆²⁻; 3 – S/SO₄²⁻.

В среду культивирования вносили 1 г/л тиосульфата натрия.

Обнаруженное окисление тиосульфата до тетрагидратата при аэробном культивировании бактерий происходит по так называемому «перекисному механизму» и не связано с работой электронно-транспортной цепи (Гриднева и др., 2009). Биологическая сущность данного процесса – обезвреживание ядовитого продукта H₂O₂, осуществляющееся при химическом взаимодействии H₂O₂ с тиосульфатом.

В микроаэробных условиях культивирования бактерий было установлено участие Sox-комплекса. Аналитическое рассмотрение продуктов окисления тиосульфата позволяет считать, что его функционирование сопряжено с работой ЭТЦ, поэтому можно предположить использование хемолитоорганотрофного типа питания бактерий в этих условиях в присутствии тиосульфата.

2.3.1.2. Анализ особенностей серного метаболизма штамма Д-507 *Sphaerotilus natans* при разных условиях питания

Бактерии штамма Д-507 *S. natans* subsp. *sulfidivorans* не были способны окислять тиосульфат при отсутствии дополнительного органического субстрата, причем была установлена независимость этого процесса от количества кислорода (от 1 до 20%) в газовой фазе. Процесс окисления серного соединения осуществлялся только в условиях одновременного внесения лактата (ацетата, сукцината). Однако для штамма Д-507 интенсивность окисления тиосульфата практически не зависела от содержания кислорода. Процесс окисления тиосульфата обеспечивал накопление в среде до 100 мг сульфатной серы в 1 л в микроаэробных условиях роста. В аэробных условиях кроме сульфата в небольшом количестве образовывался тетратионат. При этом, в микроаэрофильных условиях интенсивность окисления тиосульфата была значительно выше и имела сходство с обнаруженной у штамма Д-501 (рис. 9).

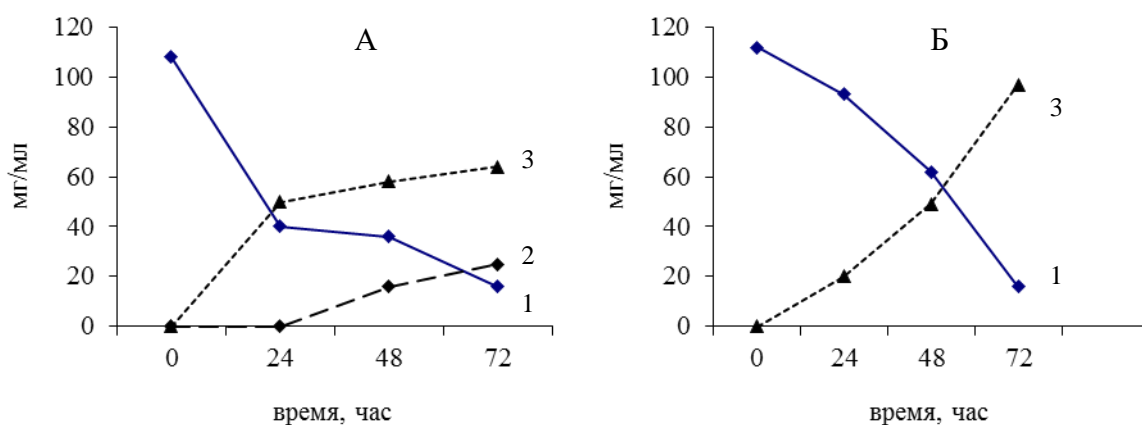


Рис. 9. Влияние содержания кислорода на динамику и продукты окисления тиосульфата у штамма Д-507 *S. natans* subsp. *sulfidivorans*. А - при 20 % O₂; Б - при 5 % O₂. 1 - S/S₂O₃²⁻; 2 - S/S₄O₆²⁻; 3 - S/SO₄²⁻. В среду культивирования вносили 1 г/л тиосульфата натрия.

2.3.2. Особенности динамики активности ферментов серного метаболизма у бактерий в разных условиях культивирования

Исследование ключевых ферментов окислительного серного метаболизма открывает возможность для точного представления осуществления биохимического механизма этого процесса. Для штамма *S. natans* subsp. *sulfidivorans* Д-501 было проведено определение интенсивности функционирования ключевых ферментов окислительного серного метаболизма. Анализ полученных данных по зависимости активности исследуемых ферментов серного метаболизма от условий аэробного культивирования *S.natans* (табл.2) показывает, что обнаружена высокая активность у двух ферментов. Максимальная скорость ферментативной реакции была характерна для АФС-редуктазы и сульфит-феррицианид-оксидоредуктазы. Характерно, что функционирование таких ферментных систем, как сульфит-феррицианид-оксидоредуктазы и АФС-редуктазы у бактерий, культивируемых при высоких концентрациях кислорода, не выявлено.

Таблица 2.

Зависимость активности ферментов серного метаболизма от содержания кислорода в среде у штаммов *S. natans* subsp. *sulfidivorans* D-501
(нмоль/(мин·мг белка))

Концентрация кислорода в газовой фазе, %			
20		5	
Сульфит-феррицианид-оксидоредуктаза	АФС-редуктаза	Сульфит-феррицианид-оксидоредуктаза	АФС – редуктаза
но	но	518	1104

но – активность не обнаружена

Анализ данных, полученных в этих экспериментах, свидетельствует, что бактерии штамма Д-501 способны эффективно окислять сульфит до сульфата в микроаэробных условиях.

В связи с этим следует отметить, что ранее в исследованиях Белоусовой Е.В. и др. (2011) были получены с помощью методов молекулярной биологии данные, подтверждающие это заключение. Так, была показана экспрессия гена *soxB*, кодирующего гидролитическую часть мультиферментного комплекса Sox, обеспечивающего трансформацию тиосульфата в сульфат. Благодаря использованию обратной транскрипции и ПЦР-анализу была установлена экспрессия гена *soxB* в клетках штаммов Д-501 (Meyer, Kuever, 2007).

Было показано, что присутствие в среде восстановленной серы является главным действующим фактором у *S.natans*, штамм Д-501, влияющим на основной метаболизм. В частности, микроаэробное культивирование интенсифицирует скорость окисления тиосульфата. Ранее в работах Гридневой Е.В. с соавт. (2009) была осуществлена количественная оценка уровня содержания транскриптов генов *soxB* и *aprBA* в микроаэробных и аэробных условиях в присутствии лактата и тиосульфата. Было показано, что экспрессия генов *soxB* выше в 7,23, а *aprBA* выше в 3,78 по сравнению с аэробными условиями культивирования.

Анализ скорости окисления серных соединений, активности ферментов серного метаболизма, а также данных молекулярно-биологического анализа позволяет сделать заключение, что в микроаэробных условиях *S.natans* штамм Д-501 осуществляет хемолитоорганотрофный тип питания согласно следующей схеме (рис. 10):

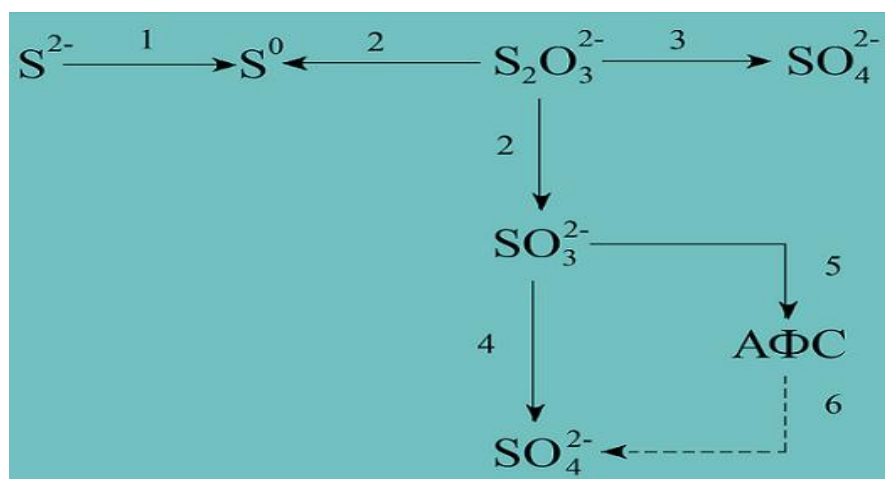


Рис. 10. Схема превращения восстановленных соединений серы у *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* Д-501

1 – сульфид-хинон оксидоредуктаза; 2 – роданаза;

3 – Sox-система; 4 – сульфитферрицианидоксиоредуктаза;

5 – АФС-редуктаза; 6 – АТФ-сульфурилаза.

← обнаружена активность фермента или детектированы гены данных ферментов;

← - - - нет данных.

Таблица 3.

Активность ферментов серного метаболизма у разных штаммов *S. natans* subsp. *sulfidivorans* при смене аэробного режима

(Е/мг белка) ($n = 3, p \leq 0,05$)

Штамм	Концентрация кислорода в газовой фазе, %			
	20		5	
	Сульфит-феррицианид-оксиоредуктаза	АФС-редуктаза	Сульфит-феррицианид-оксиоредуктаза	АФС – редуктаза
Д-507	0,929 – 1,611	1,150 – 2,762	2,554	2,915
Д-501	но	но	0,518	1,104

но – активность не обнаружена

Анализ данных изменения активности ферментов серного метаболизма в бактериях штамма Д-507 и Д-501 показывает определенные отличия. Как видно из приведенных результатов (табл.3), активность сульфит-феррицианид-оксидоредуктазы и АФС-редуктазы обнаруживается во всех вариантах культивирования штамма Д-507. Высокий уровень активности этих энзимов был выявлен как при 20 %-ном содержании кислорода в среде культивирования, так и при низкой концентрации кислорода (5 %). Следует отметить, что при микроаэробном культивировании активность сульфит-феррицианид-оксидоредуктазы и АФС-редуктазы в бактериях штамма Д-507 была выше более чем в 2 раза. Совершенно другая картина изменения активности ферментов серного метаболизма обнаружена для бактерий штамма Д-501. У этих микроорганизмов при высокой концентрации кислорода в среде культивирования активность сульфит-феррицианид-оксидоредуктазы и АФС-редуктазы отсутствовала, что свидетельствует об использовании хемогетеротрофного типа питания. Активность энзимов серного метаболизма индуцировалась у бактерий штамма Д-501 при микроаэробном культивировании, когда концентрация газообразного кислорода составляла менее 5 % (табл.2).

2.3.3. Активность ключевых ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла у штаммов *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* при разных условиях культивирования

Выбор ферментов центральных путей углеродного метаболизма был обусловлен их функциональной ролью в таких важнейших процессах как цикл трикарбоновых кислот, глиоксилатный путь и глюконеогенез. Анализ активности маркерного фермента изоцитратлиазы открывал перспективы идентификации функционирования глиоксилатного цикла в микроорганизмах при смене типов питания и культивирования.

Сукцинатдегидрогеназа, долгое время считавшаяся маркерным ферментом цикла трикарбоновых кислот, может участвовать и в функционировании других процессов. В частности это относится к утилизации янтарной кислоты, образующейся при работе глиоксилатного цикла. СДГ в этом случае окисляет сукцинат до фумаровой кислоты и оксалоацетата, являющегося акцептором аминогрупп и способного превращаться в аспартат. Аконитатгидратаза – это известный биокатализатор, обуславливающий аконитазное равновесие в клетках. Полифункциональность данной ферментной системы обусловлена ее участием в функционировании цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного пути. Анализ изменения активности изоферментного состава и регуляторных характеристик этих важнейших ферментов углеродного метаболизма должен помочь в исследовании биохимического механизма адаптивной реакции бактерий в микроаэробных условиях и при миксотрофном типе питания.

2.3.3.1. Изменение активности ферментов ЦТК и ГЦ у штамма Д-501

Исследование активности ферментов центральных метаболических путей поможет определить влияние диссимиляционных окислительных процессов серы на тип и интенсивность протекания углеродного метаболизма *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* Д-501. При этом осуществляли культивирование разными способами, отличающимися по уровню снабжения бактерий кислородом. Активность ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути, являющихся главными двигателями углеродного метаболизма, была проанализирована у бактерий штамма Д-501 в микроаэробных условиях и аэробных в присутствии лактата (табл. 4).

Активность исследуемых ферментов, как правило, связана с катализом протекания определенного катаболического или энергетического процесса. Так, ИЦЛ является маркерным ферментом глиоксилатного пути. Его высокая

активность характерна для бактерий, культивируемых в микроаэробных условиях. Как было показано ранее, данный метаболический путь участвует в осуществлении хемолитоорганотрофного питания этих микроорганизмов. Интересно отметить, что в аэробных условиях культивирования бактерий штамма Д-501 активность изоцитратлиазы незначительна или отсутствует. Можно считать ее величину в пределах ошибки. Однако при микроаэробном культивировании происходит трансформация углеродного метаболизма и глиоксилатный путь становится важным для осуществления глюконеогенеза и других метаболических потоков. Активность изоцитратлиазы составила 0,973 Е/мг белка, что на порядок выше активности этой энзимной системы в бактериях штамма Д-501, культивируемых аэробно.

Таблица 4.

Удельная активность ключевых ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла в *Sphaerotilus natans* штамм Д-501 при разных условиях аэробного культивирования

Условия культивирования	Удельная активность фермента, Е/мг белка		
	ИЦЛ	СДГ	АГ
Аэробное Лактат	0,097±0,004	0,228±0,071	0,065±0,003
Аэробное Лактат + тиосульфат	0,073±0,003	0,745±0,039	0,219±0,037
Микроаэробное (3,5% кислорода) Лактат + тиосульфат	0,973±0,044	2,808±0,093	0,216±0,041

Маркерным ферментом цикла трикарбоновых кислот считается сукцинатдегидрогеназный ферментный комплекс. Как правило, его высокая активность свидетельствует об интенсивном функционировании цикла Кребса. Полученные результаты исследования этого фермента (табл.5) показали, что максимальный уровень функционирования

сукцинатдегидрогеназы характерен для микроорганизмов, культивируемых в аэробных условиях. Известно, что при высоком уровне кислорода, который используется как акцептор электронов при окислительном метаболизме, интенсифицируется цикл трикарбоновых кислот. Активность аконитатгидратазного комплекса может характеризовать работу сразу двух циклов ЦТК и глиоксилатного пути. Обнаруженная активность аконитазы свидетельствует о достаточно высоком уровне ее активности в бактериях, культивируемых в аэробных условиях (0,219 Е/мг белка). Следует отметить высокий уровень функционирования аконитатгидратазы в микроорганизмах при микроаэробных условиях. Такая картина распределения аконитазной активности свидетельствует о полифункциональности данной ферментной системы. Аконитатгидратаза обеспечивает работу как цикла трикарбоновых кислот (катаболический путь), так и глиоксилатного пути (анаболический путь).

Таблица 5.

Общая активность энзимов ИЦЛ, СДГ и АГ в *S.natans* штамм Д-501

Условия культивирования	Активность фермента, Е/мл белка		
	ИЦЛ	АГ	СДГ
Аэробно Лактат + тиосульфат	0,043±0,003	0,219±0,002	0,783±0,003
Микроаэробно (3.5 % кислорода) Лактат + тиосульфат	0,973±0,005	0,316±0,004	1,115±0,002

Измерение удельной активности маркерного фермента цикла трикарбоновых кислот в бактериях штамма Д-501 позволило получить данные по зависимости его активности от типов питания при культивировании в аэробных и микроаэробных условиях. Анализ приведенных в таблице 5 данных позволяет выявить определенные закономерности изменения интенсивности функционирования данного

энзима. Если в аэробной среде доминирующим процессом углеродного метаболизма является цикл Кребса, то активность сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы имеет высокое значение. При этом изоцитратлиазная активность в исследуемом объекте минимальна, так как глиоксилатный цикл у них не работает. Четкая зависимость обнаруживается при анализе изменчивости всех изучаемых ферментов (АГ, ИЦЛ, СДГ) в бактериях штамма Д-501 при хемолитоорганотрофном типе питания, наблюдаемом в микроаэробных условиях. Удельная активность СДГ увеличивалась более чем в 3 раза. Функционирование изоцитратлиазы и аконитатгидратазы интенсифицировалось более чем в 10 раз, что обусловлено интенсификацией глиоксилатного цикла в микроаэробных условиях культивирования бактерий штамма Д-501. Известно, что изоцитратлиаза является маркерным ферментом, а аконитатгидратаза необходима для катализа «аконитазного равновесия», то есть для нормального функционирования глиоксилатного пути.

Таким образом, изменение функционирования изучаемых ферментов показывает четкую корреляцию между их активностью в ЦТК и ГЦ с одной стороны и направленностью основных метаболических потоков углеродного метаболизма. На основании полученных данных можно заключить, что в микроаэробных условиях бактерии *S.natans* штамм Д-501 осуществляют хемолитоорганотрофный тип питания. Об этом свидетельствует направленность и интенсивность серного метаболизма и трансформация активности ферментов, окисляющих серу. При хемолитоорганотрофном типе питания данные бактерии используют в качестве основного пути углеродного обмена глиоксилатный путь, являющийся важным этапом глюконеогенеза.

2.3.3.2. Активность ключевых ферментов ЦТК и ГЦ в бактериях штамма Д-507

В исследованиях штамма Д-507 *Sphaerotilus natans* мы создавали условия для возникновения у организма хемогетеротрофного или миксотрофного типа питания. Изучали бактерии данного штамма, которые обладали в зависимости от источника углерода хемогетеротрофным типом питания или миксотрофным. Полученные результаты по измерению ферментативной активности трех энзимов (АГ, СДГ и ИЦЛ) свидетельствуют, что эти ферменты обеспечивают функционирование важнейших метаболических путей, таких как цикл Кребса и глиоксилатный путь. Каждый из исследованных ферментов имел специфическое функционирование, катализируя реакции взаимопревращения цитрата, цис-аконитата и изоцитрата (АГ), окисление сукцината (СДГ) и распад молекулы изолимонной кислоты на глиоксилевую и янтарную кислоты (ИЦЛ). Значения общей и удельной активности ферментов из бактерий *Sphaerotilus natans*, штамм Д-507, при разных типах питания приводятся на рисунках 10-13.

Анализ полученных данных по изменению величины общей активности (Е/мл) сукцинатдегидрогеназы показал, что не обнаружено четкой зависимости ферментативной активности от типа питания. Максимальная величина активности СДГ обнаруживается для исследуемых бактерий при миксотрофном питании (рис. 11). Кроме того, большой уровень активности этой ферментной системы наблюдался при хемогетеротрофном типе питания у исследуемых микроорганизмов. Интересно, что сукцинатдегидрогеназа является маркерным ферментом митохондрий, так как его работа связана с обеспечением функционирования цикла Кребса. Большие величины активности этой ферментной системы показывают, что функционирование цикла Кребса у исследуемых бактерий осуществляется на очень высоком уровне.

Анализ значений активности маркерного фермента глиоксилатного пути изоцитратлиазы указывает на определенные отличительные особенности. Так, максимальная величина активности данного фермента обнаруживается у штамма Д-507 при миксотрофном питании (рис. 12).

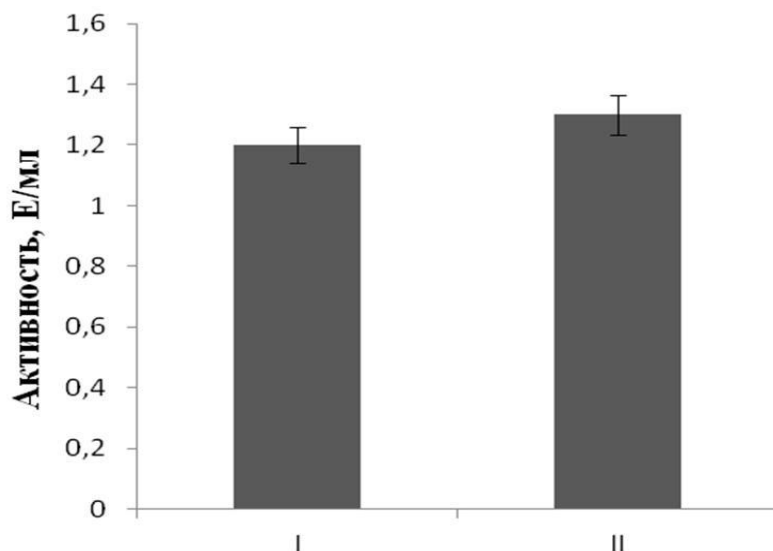


Рис. 11. Величина общей активности сукцинатдегидрогеназы при различном типе питания *Sphaerotilus natans*

I – хемогетеротрофный тип питания штамма Д-507, II - миксотрофный тип питания штамма Д-507

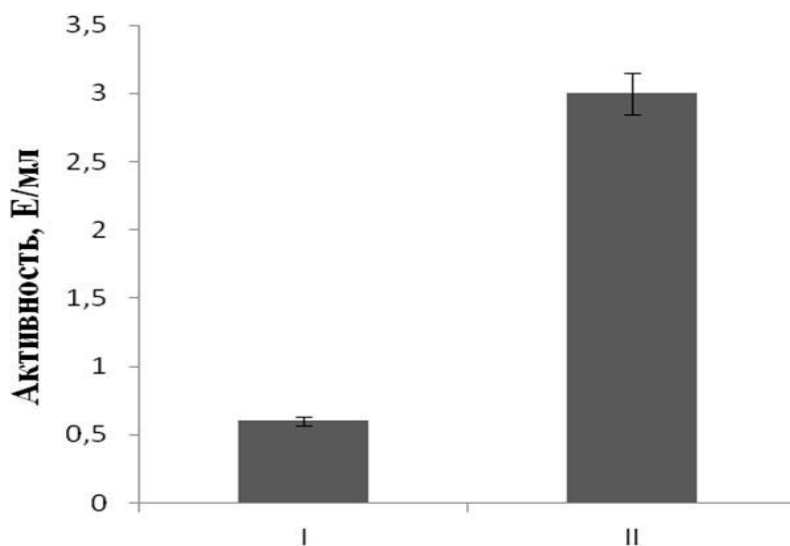


Рис. 12. Величина общей активности изоцитратлиазы при различном типе питания *Sphaerotilus natans*

I – хемогетеротрофный тип питания штамма Д-507, II - миксотрофный тип питания штамма

Д-507

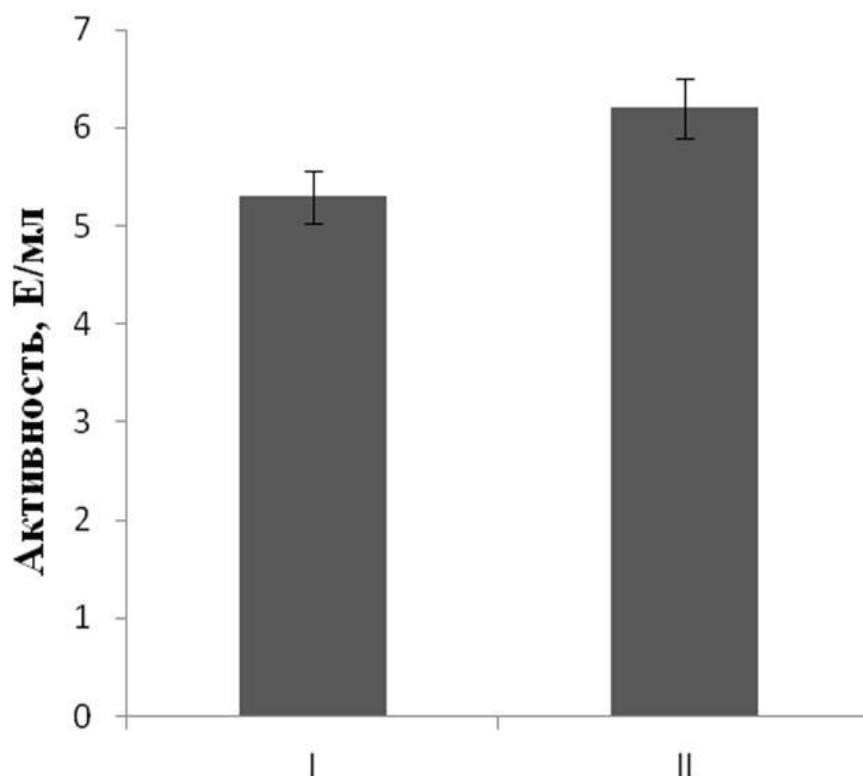


Рис. 13. Величина общей активности аконитатгидратазы при различном типе питания *Sphaerotilus natans*

I – хемогетеротрофный тип питания штамма Д-507,

II - миксотрофный тип питания штамма Д-507

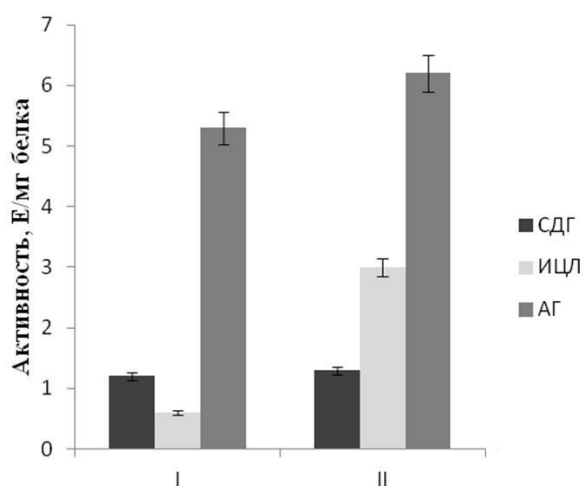


Рис. 14. Величина удельной активности ключевых ферментов ЦТК и ГЦ в бактериях *Sphaerotilus natans* при различном типе

I – хемогетеротрофный тип питания штамма Д-507,

II - миксотрофный тип питания штамма Д-507

Активность ИЦЛ в несколько раз меньше у *Sphaerotilus natans* при хемогетеротрофном типе питания по сравнению с миксотрофным. Анализ полученных результатов может свидетельствовать о функционировании глиоксилатного цикла в бактериях *Sphaerotilus natans* при миксотрофном питании. Ранее сообщалось, что в условиях миксотрофного типа питания у бактерий штамма Д-507 функционирует тетрамерная форма малатдегидрогеназы, характерная для глиоксилатного цикла (Епринцев и др., 2009). Интенсивность активности аконитатгидратазы, участвующей в обеспечении функционирования цикла Кребса и глиоксилатного пути, приведена на рисунке 13. Анализ полученных данных (рис. 14) свидетельствует о значительной величине общей активности аконитазы у всех штаммов бактерий *Sphaerotilus natans* при разных типах питания, однако наибольшее значение этой характеристики обнаружено при миксотрофном типе питания штамма Д-507.

Для выяснения влияния диссимиляционных окислительных процессов восстановленных соединений серы на протекание углеродного метаболизма *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* Д-501, выращенных при разных условиях культивирования – микроаэробно и аэробно, в присутствии тиосульфата и лактата в среде, мы измерили активность ключевых ферментов глиоксилатного цикла и ЦТК, являющихся важнейшими метаболическими путями клетки.

Оказалось, что активность ИЦЛ в микроаэробных условиях превышала таковую в аэробных примерно в 10 раз. В свою очередь результаты измерения активности СДГ также демонстрируют увеличение активности фермента в аэробных условиях – в 1,3 раза. Эти данные свидетельствуют о возрастании работы глиоксилатного цикла в микроаэробных условиях. Таким образом, вероятно, поток электронов при окислении тиосульфата поступает в ЭТЦ, тем самым удовлетворяя потребности энергетического метаболизма, что в свою очередь ведёт к снижению окислительной роли ЦТК в этом

процессе. Цикл Кребса теряет свое значение как поставщик электронов и функционирует как анаболический путь (Грабович и др., 1998).

Активность аконитатгидратазы была примерно одинакова в обоих вариантах. Этот фермент участвует в обоих циклах, поэтому эти данные вполне предсказуемы и объяснимы важной его ролью в этих процессах.

2.3.3.3. Активность сукцинатдегидрогеназы, изоцитратлиазы и аконитатгидратазы в бактериях штамма Д-380

Бактерии штамма Д-380 не способны трансформировать основной тип метаболизма при изменении условий их культивирования. Для осуществления хемогетеротрофного типа питания данный штамм использует цикл трикарбоновых кислот для окисления органических субстратов (кислот), то есть является основным энергетическим потоком. Для сравнительного анализа измерили активность маркерных ферментов сукцинатдегидрогеназы, изоцитратлиазы и аконитатгидратазы, выполняющих полифункциональную роль в метаболизме. Анализ полученных данных осуществляли сравнением уровня удельной и общей активности исследуемых ферментов. В результате было показано, что характер изменения исследуемых энзимов не зависел от формы выражения ферментативной активности. Как видно из полученных данных, максимальная активность выявляется в бактериях для аконитатгидратазной реакции. Общая активность, согласно полученным результатам, составляет 5,5 Е/мл, а удельная активность – 5,0 Е/мг белка.

Высокий уровень ферментативной активности обнаружен для сукцинатдегидрогеназы. Интенсивное функционирование этих ферментных систем, по-видимому, обусловлено их работой в цикле трикарбоновых кислот, являющимся основным метаболическим потоком, обеспечивающим катаболические процессы в бактериях штамма Д-380 при хемогетеротрофном типе питания (рис. 15, 16). Исследование активности маркерного фермента

глиоксилатного цикла изоцитратлиазы показало, что в бактериях обнаруживается ее невысокий уровень. Низкая активность, близкая к нулевому значению, однозначно свидетельствует, что у исследуемых организмов глиоксилатный цикл не функционирует.

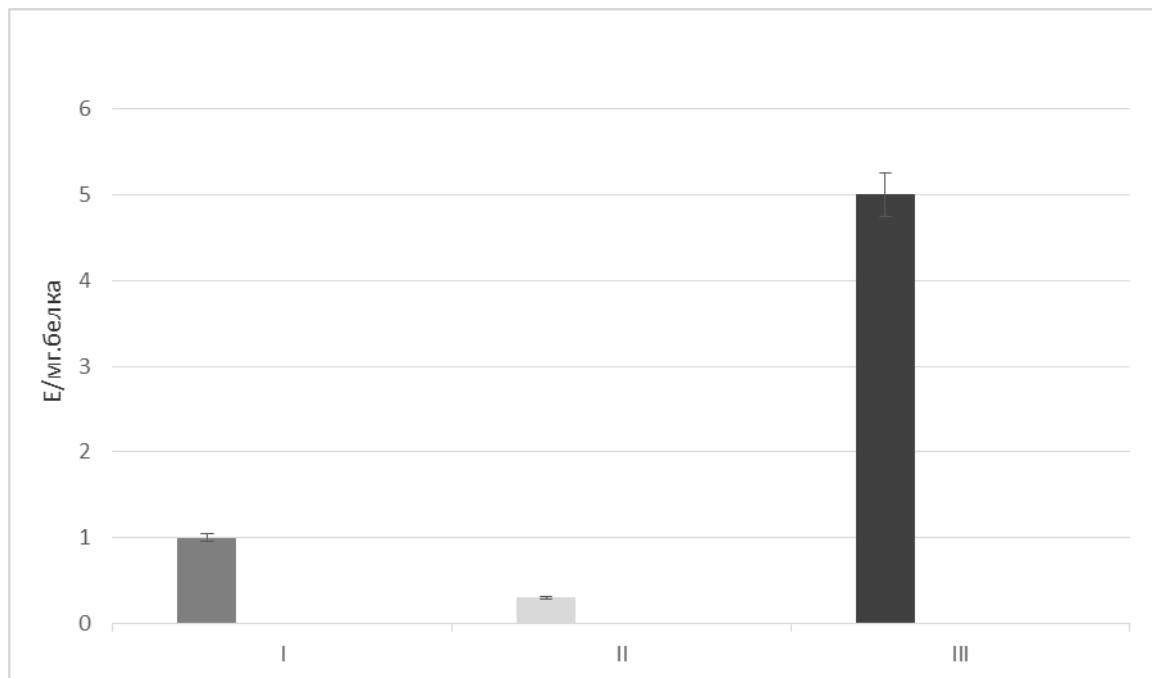


Рис.15. Удельная активность СДГ (I), ИЦЛ (II) и АГ (III) в бактериях штамма Д-380 при хемогетеротрофном типе питания

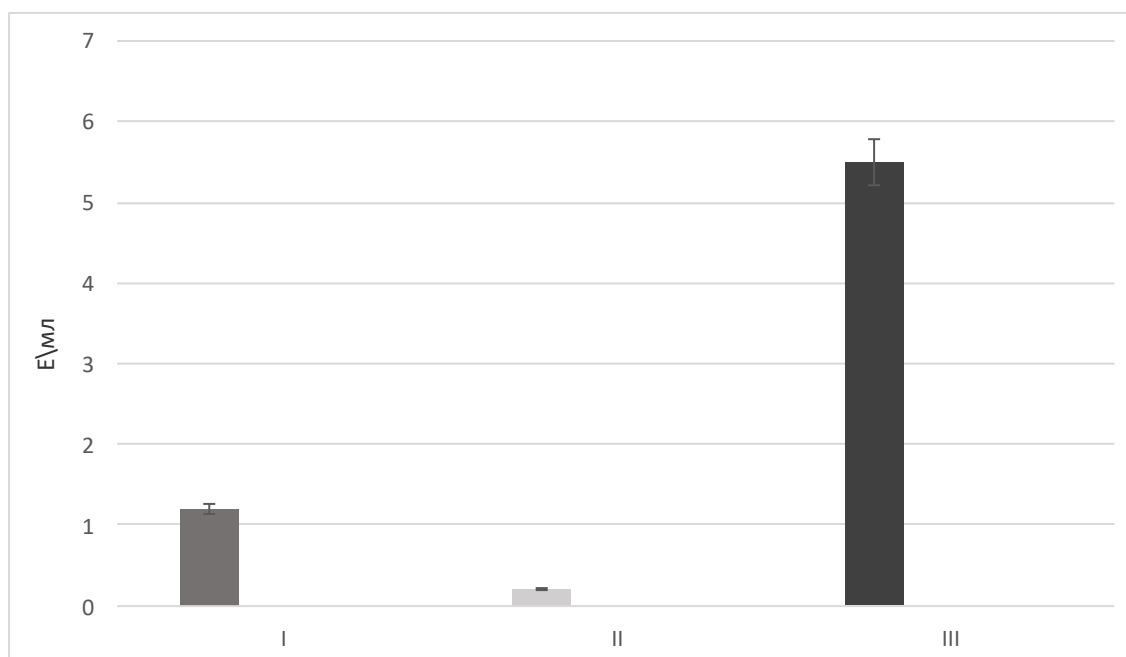


Рис.16. Общая активность исследуемых ферментов при хемогетеротрофном типе питания штамма Д-380
1 – СДГ, 2 – ИЦЛ, 3 – АГ

Следовательно, можно заключить на основании полученных данных по ферментативной активности, что бактерии штамма Д-380 *S.natans* используют цикл Кребса в качестве основного энергетического процесса. При этом, в анаболических процессах данного организма не принимает участие глиоксилатный путь, на что указывает очень низкая активность его маркерного фермента изоцитратлиазы.

2.3.4. Изоферментный состав ключевых ферментов ЦТК и ГЦ в штамме Д-501

2.3.4.1. Изоферментный состав СДГ в штамме Д-501

Трансформация метаболических процессов, возникающих при адаптивной реакции клеточного метаболизма, обеспечивающих адаптацию и рост бактерий при разных типах культивирования, может обеспечиваться изменением изоферментного состава энзимов ЦТК и глиоксилатного цикла. Маркерным ферментом цикла Кребса считается сукцинатдегидрогеназа. Однако, эта ферментная система участвует в метаболизации янтарной кислоты, возникающей в глюконеогенезе, в частности, в глиоксилатном цикле. СДГ превращает образованный в ГЦ сукцинат в фумаровую кислоту, которая в дальнейшем подвергается ферментативному превращению в малат, оксалоацетат и т.д.

Исследования изоферментного состава СДГ проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Для идентификации зон, характеризующих присутствие изоформ этого энзима, использовали тетразолиевый метод.

Получены электрофореграммы сукцинатдегидрогеназной ферментной системы, выделенные из бактерий *S.natans* штамм Д-501, культивируемых в

аэробных и микроаэробных условиях. Анализ полученных результатов (рис. 17) свидетельствует, что изучаемая ферментная система может менять

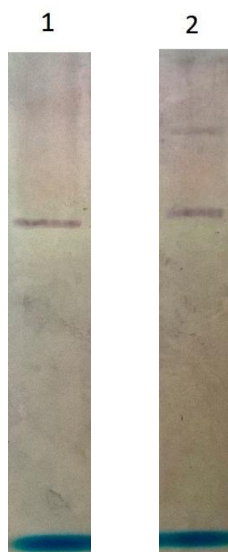


Рис.17. Изоферментный состав сукцинатдегидрогеназы из бактерий *S.natans* штамм Д-501, культивируемых при аэробном (А) и микроаэробном (В) типе питания

количество множественных молекулярных форм в зависимости от условий выращивания. В бактериях штамма Д-501 при аэробном культивировании выявлена одна изоформа СДГ с относительной электрофоретической подвижностью $R_f = 0,30$. Смена условий культивирования на микроаэробный вариант приводит к появлению дополнительной медленнодвижущейся формы СДГ. Относительная электрофоретическая подвижность индуцированного изофермента равняется 0,12. Появление дополнительной формы СДГ обусловлено, по-видимому, возникновением нового метаболического потока, что связано с трансформацией метаболизма и появлением глюконеогенеза. В результате функционирования глиоксилатного цикла синтезируется сукцинат, который утилизируется бактериальной клеткой путем окисления его до фумаровой кислоты с

последующим превращением в малат или оксалоацетат (Епринцев, Попов, 1999; Епринцев и др., 2007).

2.3.4.2. Изоферментный состав АГ в штамме Д-501

Важное значение для понимания механизмов ферментативных реакций, возникающих при аэробном и микроаэробном культивировании бактерий, имеет исследование изоферментного состава аконитатгидратазы. Известно, что этот фермент характеризуется полифункциональностью, то есть участвует в обеспечении функционирования ЦТК и глиоксилатного пути [Епринцев и др., 2007]. Анализ результатов распределения изоформ АГ в бактериях, культивируемых в разных условиях, свидетельствует, что обнаруживается одна множественная молекулярная форма при выращивании микроорганизмов в аэробных условиях (рис. 18). Относительная электрофоретическая подвижность данного изофермента составляет 0,54. При культивировании штамма Д-501 в микроаэробных условиях проявляются две изоформы исследуемого фермента. Быстродвижущаяся форма АГ имеет $R_f - 0,54$. Вторая медленнодвижущаяся изоформа характеризуется относительной электрофоретической подвижностью $R_f - 0,48$. Этот изофермент можно считать индуцибельным, так как он возникает только при микроаэробном культивировании бактерий. Появление второй дополнительной изоформы АГ можно объяснить необходимостью обеспечивать функционирование глиоксилатного пути, являющегося важнейшим этапом глюконеогенеза. Известно, что «аконитазное равновесие», которое катализирует исследуемый фермент, является обязательным звеном не только ЦТК, но и глиоксилатного цикла.

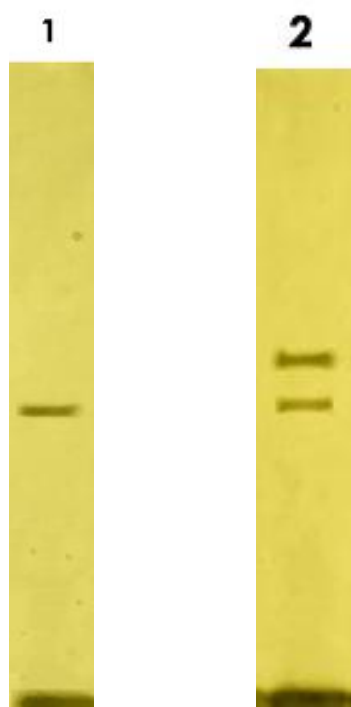


Рис.18. Изоферментный состав аконитатгидратазы в бактериях штамма Д-501 при разных условиях аэробного культивирования
1 – аэробный режим; 2 – микроаэробный режим

2.3.4.3. Изоферментный состав ИЦЛ в штамме Д-501

Исследование изоферментного состава ИЦЛ, проведенное с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в образцах бактерий штамма Д-501 при аэробном и микроаэробном культивировании имеет важное значение, так как данная ферментная система относится к маркерам глиоксилатного цикла. Результаты, приведенные на рис. 19, свидетельствуют, что изоцитратлиазная активность обеспечивается функционированием одного изофермента, который обнаруживается в бактериях в микроаэробных условиях. Относительная электрофоретическая подвижность изоцитратлиазы составляет – 0,45. Изоцитратлиаза катализирует лиазную реакцию распада

изолимонной кислоты с образованием глиоксилата и сукцината. Данная ферментативная реакция является необходимой для функционирования глиоксилатного цикла и больше нигде не встречается (Землянухин и др., 1986; Епринцев и др., 2010). Известно, что при хемолитоорганотрофном типе питания, который наблюдается у бактерий штамма Д-501 в микроаэробной среде, для углеродного метаболизма используется глиоксилатный цикл. Поэтому можно сделать заключение, что при аэробном культивировании не функционирует глиоксилатный путь, на что указывает отсутствие ферментативной изоцитратлиазной активности. В условиях микроаэробного культивирования индуцируется изоцитратлиазная активность в бактериях, что свидетельствует о работе глиоксилатного пути, являющегося этапом глюконеогенеза.



Рис.19. Изоферментный состав изоцитратлиазы в бактериях штамма Д-501 при микроаэробном (1) и аэробном (2) культивировании

2.3.4.4. Изоферментный состав СДГ в бактериях штамма Д-507

Исследования изоферментного состава, проведенные методом электрофореза в 7,5% ПААГ и специфическим окрашиванием сукцинатдегидрогеназы в бактериях штамма Д-507 *Sphaerotilus natans*, культивируемых органотрофно и миксотрофно, показали наличие двух изоформ при миксотрофном типе питания и одной формы фермента при хемогетеротрофном питании (рис. 20).

Значение относительной электрофоретической подвижности у обнаруженных изоформ составило для СДГ1 - 0,34 (быстродвижущаяся) и 0,12 – для СДГ2 (медленнодвижущаяся). Наличие двух изоформ представляет особый интерес, обусловленный полифункциональностью изучаемого фермента. Появление новой (медленнодвижущейся) формы СДГ можно объяснить необходимостью ее участия в трансформации основного типа метаболизма бактерий штамма Д-501 при миксотрофном типе питания.

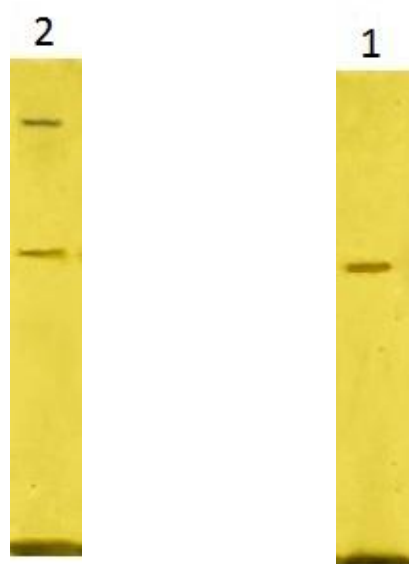


Рис. 20. Специфическое проявление сукцинатдегидрогеназы из бесцветных серобактерий *Sphaerotilus natans* (штамм Д-507) при различном типе питания: 1 - хемогетеротрофный тип питания; 2 – миксотрофный тип питания

Анализ активности исследуемых ферментов показывает, что в этом варианте эксперимента у бактерий индуцируется глиоксилатный цикл и глюконеогенетическое превращение липидов (Епринцев, Попов, 1999).

СДГ считается маркерным ферментом функционирования цикла Кребса и комплекса II ЭТЦ, однако последние сообщения в научных статьях утверждают, что фермент может участвовать в утилизации янтарной кислоты, образуемой в глиоксилатном цикле (Игамбердиев и др., 1994).

Множественные формы изучаемого фермента известны для высших растений и животных. Так, в листьях и щитках *Zea mays* L. выявлены от 2 до 4 изоформ сукцинатдегидрогеназы в зависимости от возраста растения. Высказывается предположение о различных функциях этих изозимов (Епринцев и др., 2010).

У большинства бактерий, также как и низших паразитических эукариот, появление дополнительных форм сукцинатдегидрогеназы связано с адаптацией данных организмов к изменяющимся условиям существования. Так, например, у паразитических нематод *Ascaris suum* присутствуют две различные стадии - специфичные формы комплекса II (Saruta et al., 1995).

Ранее сообщалось о возможных изменениях изоферментного состава и других ферментных систем. Так, выявлены посттрансляционные изменения структуры малатдегидрогеназы в бактериях при переключении углеводных потоков (Епринцев и др., 2009). Таким образом, было установлено, что у бесцветных серных бактерий *S. natans* штамм Д-507 присутствуют две формы фермента, имеющие разную электрофоретическую подвижность: СДГ1 с $R_f = 0,34$ и СДГ2 с $R_f = 0,12$.

2.3.4.5. Изоферментный состав аконитатгидратазы

Электрофоретические исследования изоферментного состава аконитатгидратазной ферментной системы в бактериях штамма Д-507 *S.natans*, культивируемых в миксотрофных условиях, показали наличие двух изоформ (рис.21).

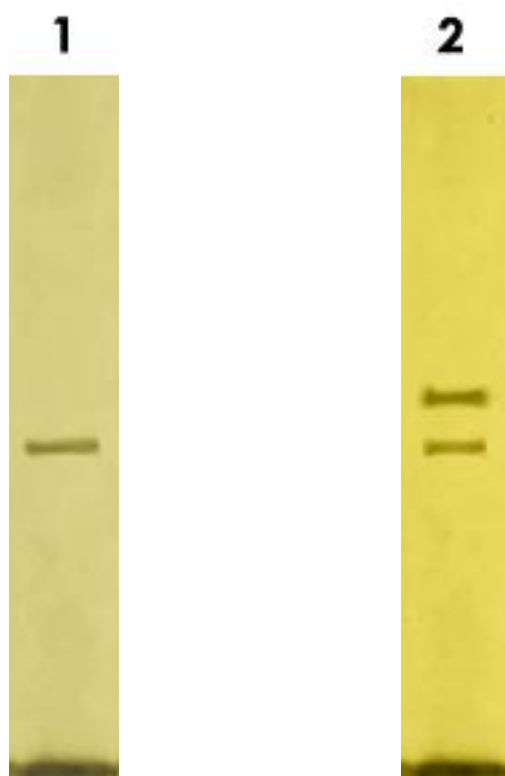


Рис.21. Изоферментный состав аконитатгидратазы из бактерий *S.natans* штамм Д-507, выращенных в условиях хемогетеротрофного типа питания (1) и миксотрофного типа питания (2)

Анализ полученных данных свидетельствует, что появление медленнодвижущейся формы исследуемого фермента обусловлено миксотрофным типом питания. При выращивании бактерий при хемогетеротрофном типе питания идентифицировалась только одна белковая полоса, соответствующая аконитазной активности с $R_f = 0,54$. Изменение типа питания с хемогетеротрофного на миксотрофный вызывало появление

новой медленнодвижущейся изоформы АГ с $R_f = 0,46$. Можно предположить, что дополнительная изоформа необходима микроорганизму для осуществления адаптивной реакции клеточного метаболизма к новым условиям питания. Следовательно, индукция глиоксилатного цикла, характерного для бактерий *S.natans* при миксотрофном типе питания, приводит к использованию реакции аконитазного равновесия, которые катализирует аконитатгидратаза. Дополнительная изоформа аконитазы обеспечивает функционирование глиоксилатного цикла, являющегося важнейшим звеном глюконеогенетического пути.

2.3.4.6. Изоферментный состав изоцитратлиазы

Маркерным ферментом глиоксилатного пути считается изоцитратлиаза, то есть ее присутствие в организме указывает на функционирование этого анаболического пути. В связи с этим значительный интерес вызывает исследование изоферментного состава ИЦЛ в штаммах Д-507 при разных типах питания. В условиях хемогетеротрофного типа питания в бактериях не обнаружена сколько-нибудь значимая активность этого энзима, и электрофоретические исследования не выявили наличия белковой зоны с активностью ИЦЛ (рис.22). Индукция изоцитратлиазной активности наблюдается в варианте эксперимента, в котором используется миксотрофный тип питания. В этих условиях индуцируется значительная активность изучаемой ферментной системы и при проведении электрофореза в полиакриламидном геле обнаруживается одна специфическая белковая полоса изоцитратлиазы (рис.21). Специфическое проявление изоцитратлиазной активности в полиакриламидном геле позволило установить наличие только одной изоформы, для которой характерна относительная электрофоретическая подвижность $R_f = 0,44$.

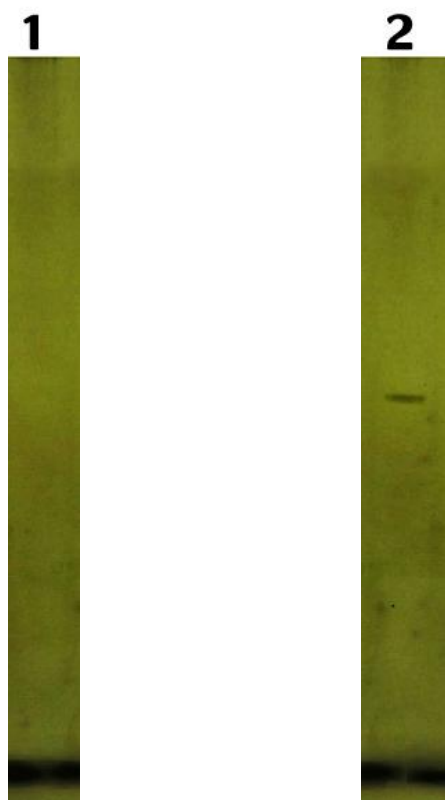


Рис.22. Изоферментный состав ИЦЛ из бактерий *S.natans* штамм Д-507, выращенных в условиях: 1 – хемогетеротрофный тип питания; 2 – миксотрофный тип питания

Наличие единственной изоформы ИЦЛ у исследуемых бактерий хорошо согласуется с ее функциональной ролью, которая заключается в обеспечении работы глиоксилатного цикла, индукция которой наблюдается при миксотрофном типе питания.

2.3.4.7.Изоферментный состав сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и изоцитратлиазы у бактерий штамма Д-380

Использование бактерий штамма Д-380 *S.natans* в качестве сравнительного образца, для которого характерен только хемогетеротрофный тип питания, позволяет сделать оценку изменения изоферментного состава исследуемых ферментов в штаммах Д-501 и Д-507. Электрофоретические исследования показали наличие в полиакриламидном геле только одного

изофермента сукцинатдегидрогеназы, при этом относительная электрофоретическая подвижность равнялась 0,30 (рис.23). Ферментная система аконитатгидратазы представлена также одной изоформой с $R_f = 0,54$.

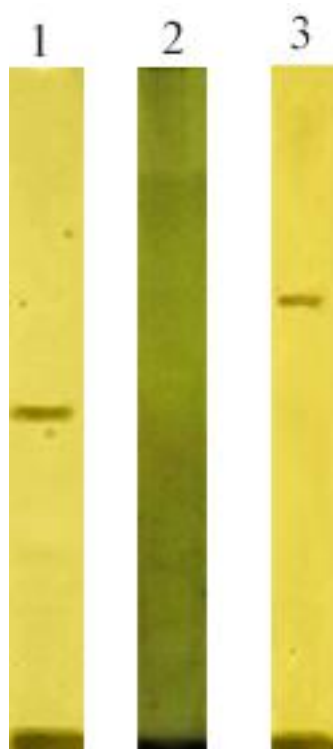


Рис.23. Специфическое проявление АГ, ИЦЛ и СДГ в бактериях штамма Д-380 при хемогетеротрофном типе питания
1 – аконитатгидратаза, 2 – изоцитратлиаза, 3 - сукцинатдегидрогеназа

Отсутствие или очень низкая активность изоцитратлиазы, маркерного фермента глиоксилатного цикла, не позволила осуществить специфическое проявление изоцитратлиазной активности в данном организме. Анализ полученных данных свидетельствует, что у бактерий штамма Д-380 не наблюдаются трансформации метаболических потоков при изменении условий культивирования, на что указывает консервативный характер изоферментного состава исследуемых ферментов (рис.23). Так, отсутствие на электрофореграмме в полиакриламидном геле изоцитратлиазной активности означает, что глиоксилатный цикл, а следовательно и такой процесс, как

глюконеогенез, для этих бактериальных организмов не характерен. Кроме того, обнаруженные изоформы СДГ и АГ в этом организме представлены одной формой. Можно считать, что эти формы СДГ и АГ функционируют исключительно в цикле трикарбоновых кислот, что согласуется с концепцией их хемогетеротрофного питания.

Бактерии *S.natans* штамма Д-380 способны нормально функционировать только в условиях хемоорганотрофного типа питания. Эти микроорганизмы не способны адаптироваться к различным условиям аэробного культивирования или миксотрофного типа питания.

2.3.5.Разделение изоформ сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы с помощью ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Sephacel и исследование их кинетических характеристик

Появление дополнительных изоформ изучаемых энзимов свидетельствует о возникновении новых вариантов адаптивной реакции клеточного метаболизма, обеспечивающих приспособление к аэробному или микроаэробному типу культивирования. Кроме того, обнаружена зависимость между изоферментным составом СДГ и АГ от типа питания бактерий *Sphaerotilus natans* разных штаммов. Появление дополнительных изоформ СДГ и АГ связано с индукцией глиоксилатного пути и развитием глюконеогенеза, который характерен для бактерий в микроаэробных условиях и при использовании хемолитоорганотрофного или миксотрофного типов питания. Для точного выяснения конкретной роли индуцированных изоформ необходимо их исследование по главным регуляторным и кинетическим характеристикам. Для проведения подобного исследования необходимо разделение множественных молекулярных форм СДГ и АГ и получение их препаратов в высокоочищенном состоянии. При этом обязательным условием является разделение изоферментов для исследования их свойств. В нашей работе для этого применяли ионообменную

хроматографию на ДЭАЭ-Sephacel. Использование в качестве ионообменника этого носителя позволяло провести эффективное разделение на отдельные компоненты изоформы исследуемых энзимов с помощью градиента концентрации КСl.

2.3.5.1. Использование ДЭАЭ-Sephacel для разделения изоформ сукцинатдегидрогеназы

Результаты разделения и очистки изоферментов сукцинатдегидрогеназы из штамма Д-501 *Sphaerotilus natans*, культивируемых в микроаэробных условиях, приведены в таблице 6. Использование трехстадийной очистки позволило получить изоферменты СДГ в высокоочищенном состоянии с удельной активностью 9,7 и 18,0 Е/мг белка. При этом степень очистки составляла для первого изофермента 44 и для второго – 81 раз. Следует отметить довольно высокий уровень выхода изоформ исследуемого фермента, который равнялся 3,8 и 7,2 % от общей активности, соответственно для первой и второй изоформ. Анализируя результаты проведенной очистки, следует отметить доминирующую роль в выполнении поставленной задачи ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Sephacel. Использование данного вида очистки позволило выполнить самую сложную задачу – разделить изоформы СДГ из бактерий штамма Д-501. Десорбция сукцинатдегидрогеназной активности с ионообменника достигалась с помощью концентрационного градиента КСl. При достижении концентрации КСl 62-63 мМ наблюдали сход с хроматографической колонки первой изоформы (СДГ1). При концентрации КСl 85-87 мМ десорбировали второй изофермент СДГ2. Следует отметить важную роль гель-фильтрации на сефадексе G-25. Использование этой стадии обеспечивало удаление низкомолекулярных соединений из белковой пробы. После этого этапа открывалась возможность эффективного применения ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Sephacel.

Таблица 6

Десорбция изоформ СДГ с помощью градиента концентрации КСІ
(штамм Д-501) ((n=3, p≤0,05)

Стадия очистки	Объём, мл	Общая активность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход %	Степень очистки	
Гомогенат	1,5	2,50	11,201	0,221	100	1	
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	2	2,30	8,501	0,270	92	1,2	
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ- Sephacel	1	1,5	0,29	0,030	9,702	3,8	44
	2	1,5	0,81	0,045	18,0	7,2	81

Использование трехстадийной очистки, включающей гомогенизацию бактериального препарата, обессоливание на колонке с сефадексом G-25 и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-Sephacel, позволило выделить в высокоочищенном состоянии изоформы СДГ из штамма Д-507 бактерий *Sphaerotilus natans*. Полученные данные, приведенные в таблице 7, свидетельствуют, что характер очистки был сходен с аналогичной процедурой, проведенной для штамма Д-501. Важное значение в схеме очистки выполняла ионообменная хроматография. Использование градиентного раствора КСІ позволяло десорбировать изоформы СДГ в изолированном состоянии. В результате проведенной очистки были получены высокоочищенные препараты изоформ СДГ с удельной активностью 8,2 и 14,6 Е/мг белка для первой и второй форм, соответственно. Хотелось бы отметить, что при проведении процедуры очистки множественных молекулярных форм СДГ были получены высокие значения

выхода ферментативной активности, составляющие 13,6 и 22 % для первой и второй изоформ, соответственно.

Таблица 7

Десорбция изоформ СДГ с помощью градиента концентрации КСІ
(штамм Д-507) (n=3, p≤0,05)

Стадия очистки	Объём, мл	Общая активность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход %	Степень очистки	
Гомогенат	1,7	3,0	12,001	0,250	100	1	
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	2	2,65	10,002	0,265	88	1,1	
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ- Sephacel	1	1,2	0,41	0,051	8,201	13,6	32
	2	1,3	0,66	0,045	14,602	22	58

Степень очистки изоформ СДГ колебалась от 32 для первого изофермента до 58 – для второго. В целом можно охарактеризовать используемую схему очистки как весьма эффективную, позволяющую получить в высокоочищенном состоянии изоферменты СДГ из разных штаммов *Sphaerotilus natans*, что открывает перспективу для изучения их регуляторных характеристик. Следует отметить, что высокоочищенные препараты всех изоформ СДГ могли сохранять свою активность в течение 48-72 часов при соблюдении низкого температурного режима (0 - +4 °С). Этого времени, как правило, было достаточно для проведения исследования электрофоретических и кинетических характеристик разделяемых изоформ.

2.3.5.2. Разделение изоформ аконитатгидратазы с помощью ионообменной хроматографии

Разделение изоферментов аконитатгидратазы и очистка их до высокоочищенного состояния открывает перспективы изучения их физико-химических и регуляторных характеристик. Для источника выделения изоформ АГ использовали штаммы *Sphaerotilus natans*, культивируемые в разных условиях. В нашей работе было показано, что при выращивании этих бактерий (штамм Д-501) в микроаэробных условиях появляется дополнительная медленнодвижущаяся изоформа аконитатгидратазы. Для проведения сравнительного изучения характеристик изоформ АГ провели трехстадийную очистку, позволившую отделить первую изоформу от второй.

Таблица 8.

Этапы очистки изоформ АГ из штамма Д-501 *Sphaerotilus natans*
(n=3, p≤0,05)

Стадии очистки	Объем, мл	Активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	3	4,10	14,0	0,29	100	1
Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-25	2,5	3,81	10,0	0,38	92	1,3
Ионообменная хроматография на колонке с ДЭАЭ-Sephacel	1,5	0,41	0,04	10,0	9,7	34,5
	1,5	0,25	0,03	8,30	6,0	28,6

Данные, приведенные в таблице 8, свидетельствуют, что используемая схема выделения и очистки позволила получить отдельно множественные молекулярные формы исследуемого фермента. С помощью трехстадийной очистки были выделены и очищены две изоформы до удельной активности 10,0 и 8,3 Е/мг белка, соответственно. Значительный выход аконитазной активности был характерен как для первой изоформы (9,7 %), так и для второй (6,0 %). Следует обратить внимание на довольно высокую степень очистки, составившую для первой изоформы 34,5 и 28,6 - для второй.

Применяемая схема очистки включала разрушение бактериальных клеток с помощью ультразвука и использование гель-хроматографии на сефадексе G-25. Этот этап обеспечивал отделение фракции белков от низкомолекулярных соединений, которые мешали эффективному проведению ионообменной хроматографии. Решающее значение для разделения изоформ исследуемого фермента имела ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Sephacel. Десорбцию изоформ АГ осуществляли с помощью концентрационного градиента КСl. При этом аконитазная активность, соответствующая первой изоформе (АГ1), сходила при концентрации хлорида калия 78-80 мМ, вторая изоформа (АГ2) десорбировалась при градиенте – 95-96 мМ КСl.

При исследовании аконитазной активности бактерий штамма Д-507 *Sphaerotilus natans*, культивируемых в миксотрофных условиях, было показано появление второй дополнительной изоформы АГ. Для установления биохимического механизма адаптивной реакции бактерий к миксотрофному питанию необходимо иметь информацию о кинетических отличиях нового дополнительного изофермента аконитатгидратазы. Разделение изоформ АГ из штамма Д-507, культивируемого миксотрофно, осуществили с помощью трех стадий очистки. На первом этапе разрушали бактериальные клетки ультразвуком и после центрифугирования получали гомогенат с довольно высокой аконитазной активностью. Перед проведением ионообменной

хроматографии на ДЭАЭ- Sephacel проводили гель-фильтрацию на сефадексе G-25 для обессоливания (отделение белков от низкомолекулярных соединений) ферментативной вытяжки. С помощью ионообменника ДЭАЭ- Sephacel осуществлено разделение аконитазной активности на два ферментативных пика.

Таблица 9.

Стадии очистки и разделения изоформ АГ бактерий штамма Д-507

Sphaerotilus natans (n=3, p≤0,05)

Стадии очистки	Объем, мл	Активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	3,5	6,20	16,501	0,375	100	1
Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-25	2,5	5,80	14,0	0,414	93,5	1,1
Ионообменная хроматография на колонке с ДЭАЭ-Sephacel	1,2	0,52	0,095	5,401	8,4	14,4
	1,5	0,45	0,074	6,0	7,3	16

Десорбцию первой изоформы АГ1 проводили с помощью концентрационного градиента КСl (77-78 мМ), второй пик (АГ2) сходил при концентрации КСl 95-97 мМ. Как видно из полученных данных (табл.9), были получены высокоочищенные препараты изоформ АГ из бактерий штамма Д-507 с удельной активностью 5,4 и 6,0 Е/мг белка, соответственно. Высокий выход аконитазной активности после заключительной стадии очистки (8,4 и 7,3 %) позволяет характеризовать применяемую схему как эффективную, способную не только разделять изоферменты, но и обеспечивать получение их для препаративных целей.

2.3.5.3. Исследование некоторых регуляторных характеристик изоформ СДГ из бактерий штаммов Д-501 и Д-507

Разделение изоформ сукцинатдегидрогеназы и получение их в высокоочищенном состоянии позволило в нашем исследовании установить их кинетические характеристики (зависимость активности от концентрации субстрата и ионов водорода). Важную роль для участия фермента в тех или иных биохимических процессах играет сродство энзима к субстрату. Известно, что данный показатель обусловлен величиной константы Михаэлиса. В нашей работе были определены значения этого важнейшего кинетического параметра для изоформ сукцинатдегидрогеназы, выделенной из штаммов Д-501 и Д-507. В таблице 10 приведены данные, свидетельствующие о величинах сродства СДГ к сукцинату. При этом значения этого показателя, определенные по методу Лайнуивера-Берка, для СДГ1 и СДГ2 показывают их определенные отличия. Как видно из полученных результатов, дополнительный изофермент СДГ1 обладал более низким сродством к основному субстрату, чем постоянно функционирующая изоформа СДГ2. Величина константы Михаэлиса равнялась 0,712 мМ и была на 10-15 % выше аналогичного показателя для СДГ2 (0,624 мМ). Интересно отметить, что появление у штамма дополнительной изоформы СДГ вызывалось микроаэробным культивированием бактерий штамма Д-501. Следовательно, можно предполагать, что адаптивная реакция, обеспечивающая приспособление этого организма к новым внешним условиям, использовала новый изофермент с меньшим сродством к сукцинату. Сходная картина изменения значений K_m для дополнительного фермента СДГ1 наблюдалась для бактерий штамма Д-507 при культивировании их миксотрофным способом. Как видно из полученных данных (табл.10), сродство медленнодвижущейся изоформы СДГ было меньше, чем для изоформы СДГ, постоянно функционирующей в этих

бактериях. Значение K_m для СДГ1 из *Sphaerotilus natans* составило 0,645 мМ, тогда как величина этого параметра для СДГ2 равнялась 0,498 мМ. Следовательно, из анализа приведенных данных можно заключить, что сродство дополнительной изоформы (СДГ1) на 12-14 % меньше аналогичного показателя для СДГ2.

Таблица 10.

Регуляторные свойства изоформ СДГ1 и СДГ2 в штаммах Д-501 и Д-507

Свойства	Штамм Д-501		Штамм Д-507	
	1	2	1	2
K_m (сукцинат, мМ)	0,712	0,624	0,645	0,498
pH (сукцинат)	7,5	7,7	7,4	7,5

Известно, что бактерии штамма Д-507 в миксотрофных условиях культивирования осуществляют трансформацию основного метаболизма, включая функционирование глиоксилатного цикла. Продуктом этого пути является янтарная кислота, для дальнейшей утилизации которой требуется ее ферментативное превращение. Можно предположить, что именно утилизацию глиоксилатного сукцината осуществляет дополнительная изоформа сукцинатдегидрогеназы бактерий штамма Д-507 при миксотрофном типе питания.

Одним из важнейших регулирующих факторов ферментативной активности является концентрация ионов водорода. Известно, что большинство изоформ ферментов отличается по величинам pH-оптимумов. Данные, полученные в ходе наших исследований, приведены в таблице 10. Анализ результатов исследований показывает, что изоформа СДГ1,

выделенная из бактерий штамма Д-501, в условиях аэробного культивирования составляет 7,5, а для дополнительной формы СДГ2, выделенной из бактерий штамма Д-501 - 7,7. Сходная картина изменения величины рН-оптимума выявлена для двух изоферментов СДГ, функционирующих в бактериях штамма Д-507 при миксотрофном типе питания (табл.10). Интересно отметить, что наблюдаемый сдвиг рН для СДГ1 в более кислую область, возможно, объясняет условия микроокружения для функционирования комплекса ферментов (метаболона) при осуществлении глиоксилатного цикла и глюконеогенеза.

Для ферментной системы, осуществляющей аконитазное равновесие, характерна полифункциональность, то есть участие в осуществлении нескольких метаболических потоков. Важнейшими из них являются цикл трикарбоновых кислот и глиоксилатный путь.

При исследовании изоферментного состава АГ бактерий было установлено, что при микроаэробном культивировании появляется дополнительная полоса, характерная для изоформы АГ1. Анализ кинетических характеристик, приведенных в таблице 1, показывает, что сродство к субстратам у АГ1 и АГ2 различно (табл.11). Величина K_m по цитрату для АГ1 меньше, чем для АГ2. Следовательно, сродство этой формы АГ больше к цитрату, чем у изофермента АГ2. При этом величина K_m почти в 1,5 раза выше для изоформы, участвующей в функционировании глиоксилатного пути. Аналогичная картина характерна для свойств изоферментов аконитазы, выделенных из бактерий штамма Д-507 при миксотрофном культивировании. Так, значение этого показателя для АГ1 - 2,121 мМ, а для второго изофермента АГ2 – 2,837 мМ. Противоположная картина величин константы Михаэлиса обнаружена при использовании в качестве субстрата изоцитрата. Следует отметить, что сродство обоих изоферментов АГ к изоцитрату гораздо больше, чем к лимонной кислоте. При этом наблюдается картина, свидетельствующая, что величины K_m колеблются в незначительной мере от типов культивирования бактерий

S.natans. Анализ полученных результатов исследования кинетических характеристик изоформ АГ, обеспечивающих функционирование цикла Кребса и глиоксилатного пути в бактериях штаммов Д-501 и Д-507, свидетельствует, что обнаруживаются определенные особенности их свойств. Возможно, трансформация основных метаболических потоков в этих бактериях, обусловленная разными условиями культивирования, обеспечивается включением дополнительных биохимических механизмов, в функционировании которых принимают участие изоформы СДГ и АГ. Установление значений рН-оптимумов для АГ1 и АГ2, функционирующих в бактериях штаммов Д-501 и Д-507, показало их незначительный разброс (табл.11).

Таблица 11.

Основные регуляторные свойства изоформ АГ1 и АГ2

в штаммах Д-501 и Д-507 *S.natans* при разных типах культивирования

Свойства	Штамм Д-501		Штамм Д-507	
	1	2	1	2
K_m (цитрат, мМ)	2,615	3,056	2,121	2,837
K_m (изоцитрат, мМ)	0,485	0,319	0,396	0,400
рН (цитрат)	7,3	7,15	7,5	7,2
рН (изоцитрат)	7,1	7,2	7,3	7,15

Вариабельность данного показателя составляла от 7,1 до 7,3 при использовании изоцитрата. Если в качестве субстрата выступал цитрат, то значения рН для максимальной реакции колебались от 7,15 до 7,5. Полученные данные не противоречат результатам, опубликованным в научной литературе. Во многих статьях отмечается, что значение рН-оптимума для аконитатгидратазы из растений может изменяться от 7,0 до 7,5

(Епринцев и др., 2010). Имеются сообщения для бактериального фермента о том, что величина данного показателя может варьировать от 6,5 до 8,2.

2.3.6. Экспрессия генов исследуемых ферментов ЦТК и ГЦ у бактерий разных штаммов *S.natans* при изменении условий культивирования

2.3.6.1. Экспрессия генов изоцитратлиазы, аконитатгидратазы и сукцинатдегидрогеназы *S.natans*, штамм Д-501 при изменении аэробного режима культивирования

Известно, что трансформация активности ферментных систем зависит от многих факторов, однако изменение скорости экспрессии генов, кодирующих конкретный фермент, является доминирующим в этом процессе. Оценка интенсивности скорости экспрессии генов, кодирующих ИЦЛ, АГ и СДГ, изучалась у бактерий штамма Д-501, культивируемых в аэробных и микроаэробных условиях. Использование метода полимеразной цепной реакции в реальном времени с применением интеркалирующего красителя Sybr Green позволяет дать оценку интенсивности транскрипции генетического материала. Проведено исследование уровня транскриптов гена *icl* в организмах, культивируемых в микроаэробных и аэробных условиях.

Наибольший уровень концентрации транскриптов для *icl* выявлен у бактерий в микроаэробных условиях (рис.24). При культивировании в микроаэробных условиях бактерий штамма Д-501 индуцируется глиоксилатный цикл, маркерным ферментов которого является изоцитратлиаза. Анализ полученных данных позволяет заключить, что уровень транскриптов *icl* вырос у бактерий в условиях микроаэробного культивирования в несколько десятков раз (рис.24). Полученные данные хорошо согласуются с резким увеличением активности изоцитратлиазы при смене условий культивирования бактерий. При этом в условиях

микроаэробного культивирования глиоксилатный цикл обеспечивает анаболическое направление обмена веществ в бактериальной клетке штамма Д-501.

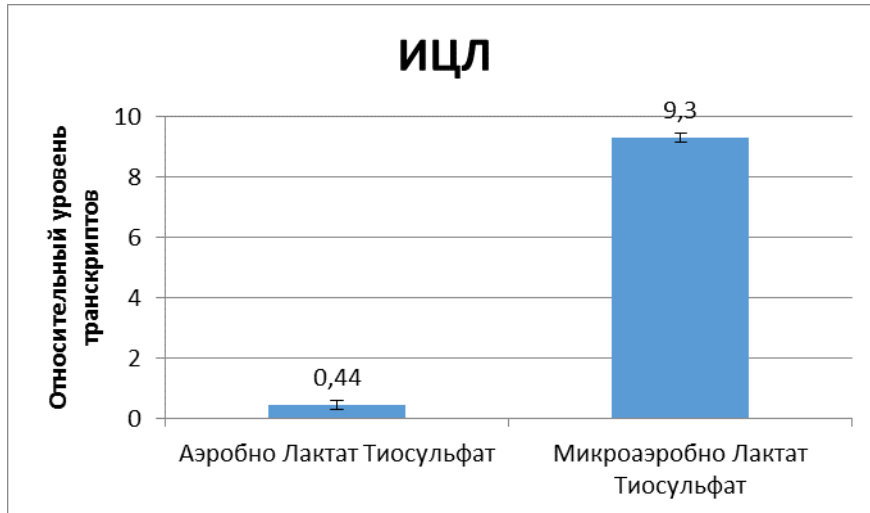


Рис.24. Относительный уровень транскриптов гена ИЦЛ в бактериях штамма Д-501 при микроаэробных и аэробных миксотрофных условиях

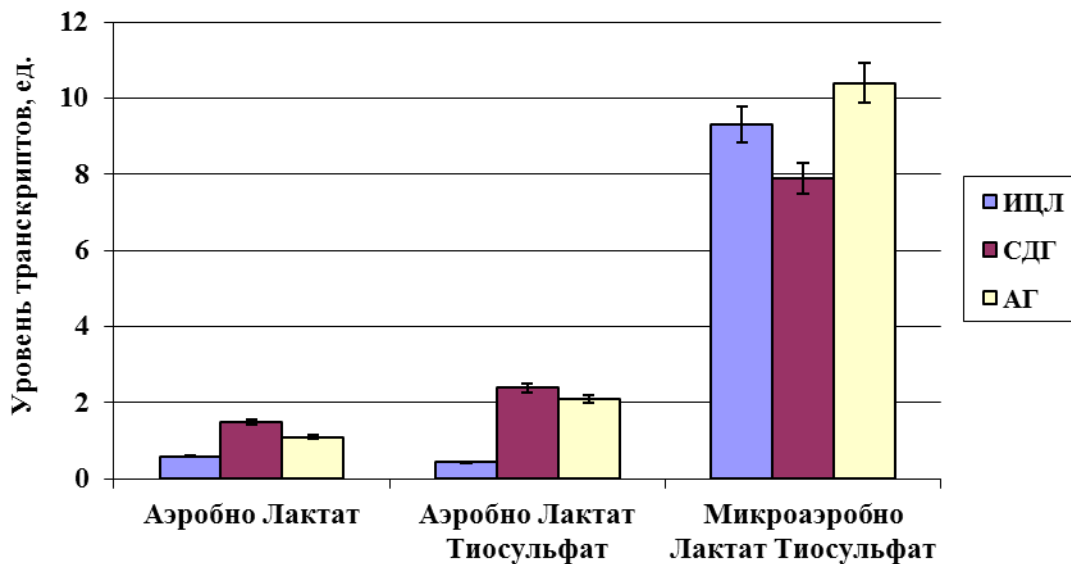


Рис. 25. Уровень экспрессии генов исследуемых ферментов у штамма Д-501 *Sphaerotilus natans* при разных условиях культивирования

В нашей работе показано, что в этих условиях культивирования бактерий штамма Д-501 роль глиоксилатного цикла увеличивается, так как донором энергетических электронов является окисление тиосульфата, то есть осуществляется хемолитоорганотрофный тип питания.

При анализе изменения экспрессии генов, кодирующих аконитазу и сукцинатдегидрогеназу, в бактериях штамма Д-501 в разных условиях аэробного культивирования, обнаружены важные особенности (рис. 25). Анализ полученных результатов (табл.12) свидетельствует, что уровень транскриптов генов *aco* и *sdh* имеет значительные изменения, в зависимости от условий среды. Изменение уровня концентрации мРНК, выявленные для гена *sdh*, связано с аэробным или микроаэробным культивированием. Максимальная экспрессия этого гена характерна для бактерий штамма Д-501, находящихся в микроаэробной среде. Концентрация транскриптов *sdh* в этом случае увеличивается в 5 раз (табл.12).

Таблица 12.

Относительный уровень экспрессии генов, кодирующих сукцинатдегидрогеназу и изоцитратлиазу, в штамме Д-501 *Sphaerotilus natans* при разных типах культивирования (n = 3, p≤0,05)

Условия культивирования	Уровни транскриптов генов		
	<i>sdh</i>	<i>aco</i>	<i>icl</i>
Аэробно Лактат	1.5	1,1	0,6
Аэробно Лактат + тиосульфат	2.4	2,1	0.44
Микроаэробно (3% кислорода) Лактат + тиосульфат	7.9	10,4	9.3

Значительной вариации величины экспрессии подвержен ген *aco*, кодирующий фермент аконитатгидратазу. При микроаэробных условиях увеличивается уровень транскриптов этого гена в 10 раз, что вероятно связано с полифункциональностью аконитатгидратазы, которая участвует не только в функционировании ЦТК, но и глиоксилатного пути – важнейшего этапа глюконеогенеза.

2.3.6.2. Идентификация генов, кодирующих изоферменты ключевых энзимов ЦТК и ГЦ в бактериях штамма Д-507 *S. natans* при разных условиях питания

Количественные показатели экспрессии генов *sdh*, *icl* и *aco*, определенные методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, показывают, что обнаруживается их корреляция у бактерий штамма Д-507 в зависимости от типа питания. Анализ полученных данных (рис. 26) указывает, что относительный уровень транскриптов генов *sdh*, *icl* и *aco* у бактерий при разных типах питания сильно различается. Наибольшая величина этого показателя обнаружена для экспрессии гена *icl*, что, вероятно, можно объяснить биосинтезом большого количества фермента изоцитратлиазы *de novo*, который необходим для функционирования глиоксилатного цикла. Известно, что помимо традиционного участия энзима в функционировании ЦТК и комплекса II ЭТЦ, СДГ осуществляет каталитическое превращение сукцината в глюконеогенезе (Епринцев и др., 1999) скорее всего увеличение уровня транскрипции данного гена в условиях миксотрофного типа питания связано именно с синтезом дополнительной формы СДГ.

Анализ уровня транскрипции гена *icl* показал, что данный показатель коррелирует со значениями активности данного фермента при разных условиях питания. Количество транскрипта гена *icl* при миксотрофном типе питания в 1,5 раза больше по сравнению с данным показателем при

хемогетеротрофном питании. Как видно из данных, приведенных на рис.25, для гена *sdh* характерен высокий уровень экспрессии в бактериях как при хемогетеротрофном, так и при миксотрофном типе питания. Однако следует отметить более высокие значения этого показателя при миксотрофном типе питания (0,06 отн.ед.) по сравнению с хемогетеротрофным (0,04 отн.ед.).

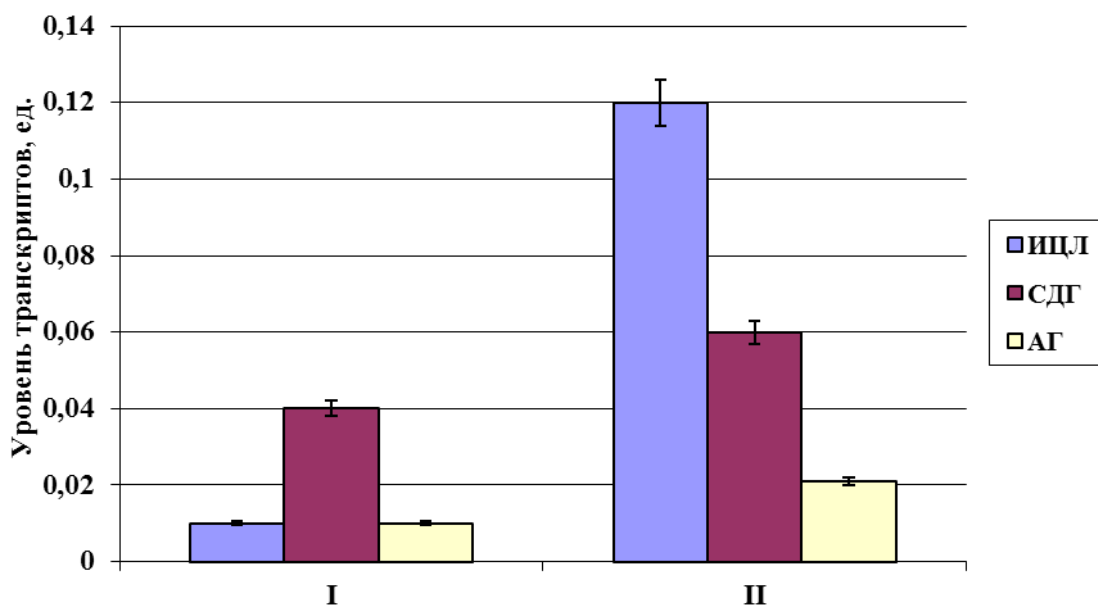


Рис.26. Относительный уровень транскрипции генов *icl*, *sdh* и *aco* при различных типах питания бактерий *Sphaerotilus natans*
 I – хемогетеротрофный тип питания штамма Д-507,
 II - миксотрофный тип питания штамма Д-507.

Относительный уровень транскрипции гена *aco* у *S. natans* штамма Д-507 оставался приблизительно на одном уровне и при хемогетеротрофном и при миксотрофном типе питания (рис. 26). Анализ полученных данных свидетельствует о значительной величине концентрации транскриптов гена аконитазы у всех штаммов бактерий *Sphaerotilus natans* при разных типах питания, что, по-видимому, можно объяснить полифункциональностью данной ферментной системы, обеспечивающей «аконитазное равновесие» не только в цикле Кребса, но и в глиоксилатном пути.

2.3.6.3. Экспрессия изучаемых генов в бактериях штамма Д-380 при хемогетеротрофном типе питания

В качестве образца бактерий с консервативным хемогетеротрофным типом питания, не меняющимся в зависимости от типа культивирования, использовали бактерии штамма Д-380. В бактериях данного штамма обнаружена экспрессия генов всех исследуемых ферментов ЦТК и ГЦ (рис.27).

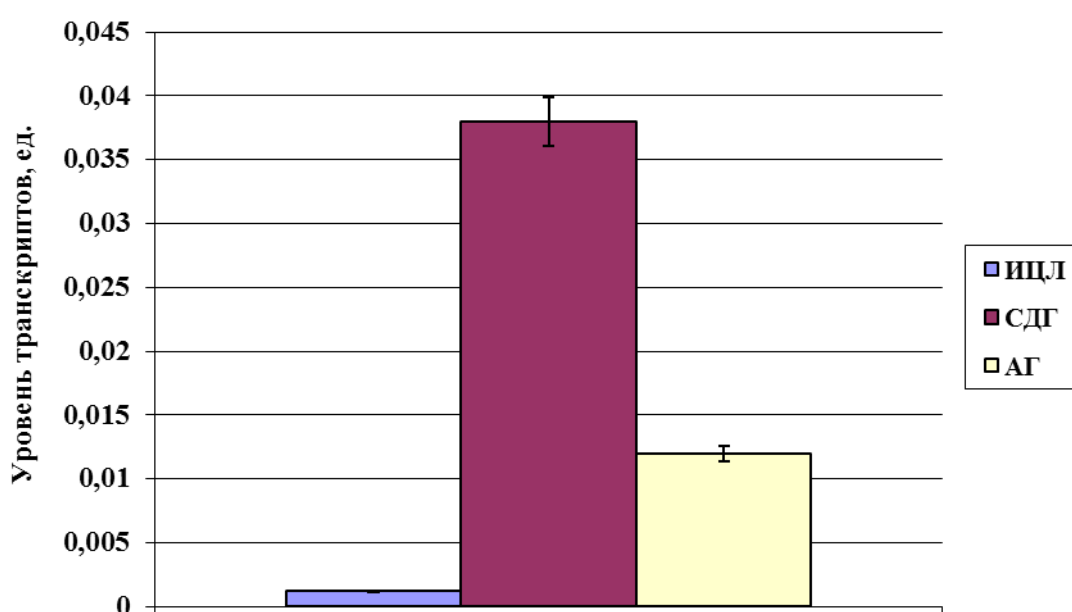


Рис.27. Относительный уровень транскрипции генов *icl*, *sdh* и *aco* при хемогетеротрофном типе питания штамма Д-380 *Sphaerotilus natans*

Максимальные значения уровня транскриптов гена *sdh* наблюдали у бактерий, обладающих хемогетеротрофным типом питания. Относительный уровень экспрессии гена, кодирующего СДГ, составлял 0,038 отн. ед. и вполне был сопоставим по уровню транскриптов аналогичного гена из штамма Д-507 в условиях хемогетеротрофного питания. Довольно высокий уровень транскриптов характерен для гена *aco*, равнявшийся 0,012 отн. ед. Высокая экспрессия *sdh* и *aco* необходима, вероятно, для синтеза достаточного количества ферментов СДГ и АГ, которые обеспечивают функционирование цикла Кребса. ЦТК является главным метаболическим

потоком у бактерий штамма Д-507 при хемогетеротрофном типе питания. Весьма характерно, что уровень экспрессии гена *icl* был очень низким (0,0012 отн. ед.), что может быть объяснено отсутствием функционирующего глиоксилатного цикла, который характерен для организмов, обладающих хемолитоорганотрофным типом питания.

Таким образом, у разных штаммов бактерий *Sphaerotilus natans* исследован профиль экспрессии генов, кодирующих маркерные и ключевые ферменты ЦТК и глиоксилатного цикла при разных типах питания. Профиль экспрессии генов свидетельствует об избирательном синтезе ключевых энзимов ЦТК и ГЦ, зависящем от необходимости переключать метаболические потоки при адаптации бактерий к микроаэробному культивированию (штамм Д-501) или миксотрофному типу питания (штамм Д-507). При миксотрофном типе питания в клетках этих бактерий функционирует одновременно глиоксилатный шунт и цикл трикарбоновых кислот. При хемогетеротрофном типе питания у штаммов Д-507 и Д-380 функционировал только цикл трикарбоновых кислот, обеспечивающий их катаболические потребности.

2.3.7. Синтез полигидроксибутиратов (PHB)

При микроаэробном хемолитогетеротрофном посеве нами было замечено разительное визуальное отличие клеток *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* Д-501 от клеток, выращенных аэробно. Нити имели большее количество глобул полигидроксибутирата (рис.28).

Как было показано ранее, полигидроксибутираты синтезируются бактериями в стрессовых условиях, каким вероятно в данном случае является низкое содержание кислорода в среде.

Нами также было обращено внимание на то, что в микроаэробных хемолитогетеротрофных условиях прирост биомассы ниже, чем при аэробном хемолитогетеротрофном типе питания. Мы предположили, что

лактат, как источник углерода и энергии, может расходоваться на синтез полигидроксибутиратов.

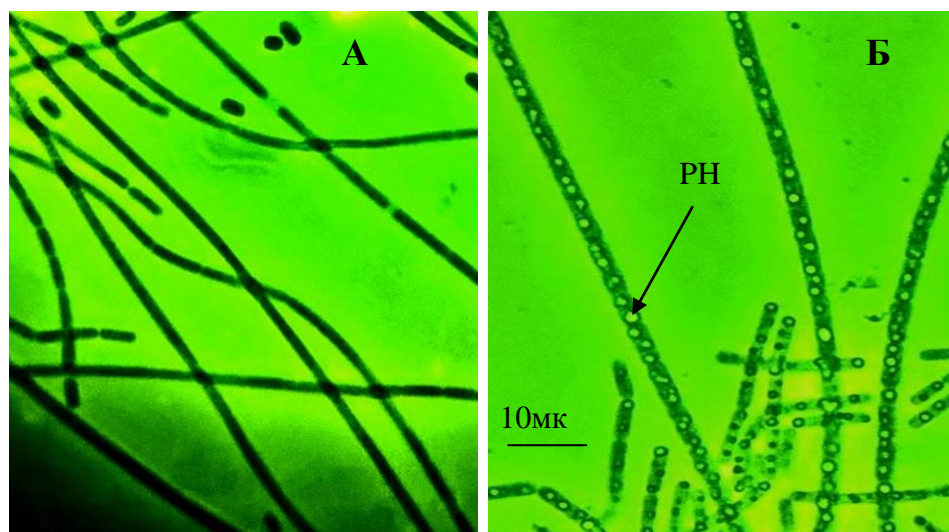


Рис.28. Клетки *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* Д-501 в аэробных (А) и микроаэробных условиях (Б)

Таблица 13.

Активность фермента лактатдегидрогеназы у *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* Д-501 при разных условиях культивирования

Условия культивирования	Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), Е/мг белка
Аэробно лактат+тиосульфат	0,029±0,002
Микроаэробно лактат+тиосульфат	0,182±0,007

Для проверки нашего предположения мы измерили активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (табл. 13). Оказалось, что активность ЛДГ в микроаэробных условиях практически в 6 раз выше, чем в аэробных, что косвенно указывает на то, что часть используемого клетками лактата идёт на синтез ацетил-СоА, который в свою очередь направляется на синтез полигидроксибутиратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Долгое время считалось, что бактерии *Sphaerotilus natans* являются органогетеротрофными микроорганизмами, использующими широкий спектр органических субстратов (Дубинина, 1989). Однако стало известно, что бактерии, обнаруженные и выделенные из термальных сульфидных водоемов, используют восстановленные серные вещества в качестве антиоксидантов (Белоусова, 2011). Однако, обнаружение в новом подвиде *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* литогетеротрофии сильно расширило представление об особенностях этих микроорганизмов.

Было показано, что бактерии *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* штамм Д-501 используют диссимиляционный серный метаболизм, и восстановленные соединения серы играют важную функциональную роль в жизни бактерий. Концентрация кислорода в среде культивирования оказывала значительное влияние на способность бактерий штамма Д-501 использовать восстановленные соединения серы. Низкая концентрация кислорода (5 %) в газовой фазе вызывала усиление окислительных диссимиляционных процессов серных молекул. Ранее была продемонстрирована способность этих микроорганизмов к хемолитогетеротрофному типу питания на уровне детекции генов главных энзимов, катализирующих диссимиляционные процессы восстановленных серных соединений - *aprBA*, *soxB* и *sqr*, кодирующих такие ферменты, как АФС-редуктаза, тиосульфатрасщепляющий комплекс и сульфид-хинон оксидоредуктаза. Было выявлено, что концентрация транскриптов генов *aprBA* и *soxB* в микроаэробных условиях была намного выше, чем в аэробных (Белоусова, 2011). В нашей лаборатории было показано, что для бактерий штамма Д-507 характерна смена типов питания с хемогетеротрофного на миксотрофный. Анализ полученных данных показал, что для этих бактерий практически не имеют значения условия аэробного или микроаэробного

культивирования. В аэробных и микроаэробных условиях у бактерий штамма Д-507 наблюдали способность окислять тиосульфат в присутствии дополнительного органического субстрата (лактата). Следует отметить, что для этого штамма интенсивное окисление тиосульфата практически не зависело от концентрации кислорода в среде культивирования. В определенной степени это подтверждается данными активности ферментов серного метаболизма у разных штаммов (Д-501 и Д-507) при смене аэробного режима. При 20 %-ной концентрации кислорода активность сульфитферрицианидоксиоредуктазы и АФС-редуктазы в бактериях штамма Д-501 не обнаружена, тогда как в микроорганизмах штамма Д-507 данные ферменты проявляют в этих условиях высокую активность (табл.2).

Исследование адаптивной реакции углеродного метаболизма проводили на бактериях, в которых моделировали смену типа питания путем изменения условий аэробного культивирования (штамм Д-501) или смены типа питания с хемогетеротрофного на миксотрофный (штамм Д-507).

Анализ данных по изменению функционирования важнейших ферментов ЦТК и глиоксилатного пути позволяет выявить определенные закономерности адаптации бактерий *Sphaerotilus natans* subsp. *Sulfidivorans* к смене типов их питания. Переход к хемолитогетеротрофии у бактерий штамма Д-501 в микроаэробных условиях и при миксотрофном питании штамма Д-501 вызывал трансформацию основного углеродного метаболизма. Индукция активности маркерного фермента изоцитратлиазы при хемолитоорганотрофном питании свидетельствовала о включении функционирования глиоксилатного цикла – важнейшего этапа глюконеогенеза. При этом активность ИЦЛ возрастала на порядок в бактериях как при микроаэробном культивировании, так и при миксотрофном типе питания. Важным подтверждением индукции функционирования глиоксилатного цикла в бактериях *Sphaerotilus natans* при трансформации углеродного метаболизма служат данные по специфическому проявлению изоцитратлиазной активности в полиакриламидном геле. Была

обнаружена одна изоформа этого фермента с относительной электрофоретической подвижностью ($R_f = 0,44-0,45$). Кроме того, с помощью методов молекулярной биологии было установлено, что хемолитоорганотрофный тип питания в микроаэробных условиях (штамм Д-501) и миксотрофное питание (штамм Д-507) индуцируют экспрессию гена *icl*, кодирующего маркерный фермент ИЦЛ. Высокий уровень транскриптов *icl* обуславливает биосинтез этой ферментной системы, являющейся маркером глиоксилатного пути, который выполняет конструктивную функцию в данных условиях.

Полученные данные по увеличению активности и изменению изоферментного состава сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы (появление дополнительных изоформ) при микроаэробном культивировании (Д-501) и миксотрофном типе питания (Д-507) свидетельствуют о перестройке метаболизма у бактерий и осуществлении адаптивной реакции к возникшим условиям.

Особую роль для понимания биохимических механизмов трансформации углеродного метаболизма у исследуемых бактерий играют данные по разделению изоформ СДГ и АГ. Использование трехстадийной очистки, ключевым этапом которой была ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Sepharcel позволило разделить изоформы этих ферментов и получить их высокоочищенные препараты с высокой удельной активностью. При этом наблюдался значительный уровень выхода ферментативной активности, который варьировал от 4 до 10 %. Анализ результатов регуляторных характеристик показал, что по сродству к субстратам (K_m) и значениям оптимальной концентрации ионов водорода (рН-оптимум) дополнительные (индуцибельные) изоформы сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы отличались от постоянно присутствующих (конститутивных) форм этих энзимов. Величина K_m при использовании в качестве субстрата цитрата для АГ1 меньше, чем для дополнительной формы аконитазы (АГ2). При этом значение K_m почти в 1,5 раза выше для изоформы, участвующей в

функционировании глиоксилатного пути. Аналогичная картина характерна для свойств изоферментов аконитазы, выделенных из бактерий штамма Д-507 при миксотрофном культивировании (табл.9). Можно предположить, что дополнительные изоформы АГ и СДГ функционируют в новых фермент-субстратных комплексах (метаболонах), где наблюдаются другие условия микроокружения по сравнению с циклом трикарбоновых кислот (Березов, Коровкин, 1998; Блюменфельд, Плешанов 1986), к которым индуцибельные формы энзимов адаптированы.

Молекулярно-биологические методы с применением специфических праймеров позволили выяснить роль генетических структур в регуляции транскрипции генов *icl*, *aco*, *sdh*, кодирующих биосинтез ферментов, которые обеспечивают функционирование цикла Кребса, глиоксилатного пути и глюконеогенеза в бактериях *Sphaerotilus natans* при смене типов аэробного культивирования и питания. Наибольший уровень концентрации транскриптов гена *icl*, обнаруженный у бактерий, культивируемых в микроаэробных условиях (штамм Д-501) и при миксотрофном питании (штамм Д-507), хорошо коррелирует с индукцией активности ИЦЛ в этих условиях и четко указывает на индукцию в углеродном метаболизме глиоксилатного цикла.

Анализ изменения экспрессии генов *aco* и *sdh* в исследуемых бактериях при разных условиях культивирования выявил важные особенности их функционирования. Уровень транскриптов этих генов в бактериях обнаруживает четкую корреляцию от условий культивирования. Так, при аэробном культивировании (штамм Д-501) или миксотрофном типе питания (штамм Д-507) уровень транскриптов гена *aco* увеличивается в 5-10 раз. Вероятно, это можно объяснить полифункциональностью аконитазы, участвующей в функционировании не только цикла трикарбоновых кислот, но и глиоксилатного пути, индуцируемого в бактериях в этих условиях культивирования.

Величина уровня концентрации мРНК, выявленная для гена *sdh*, проявляла четкую зависимость от условий культивирования микроорганизмов. Наибольшая экспрессия *sdh* была характерна для бактерий, выращиваемых в микроаэробных условиях или при миксотрофном типе питания. В этих условиях наблюдалось увеличение концентрации транскриптов гена, кодирующего СДГ, в несколько раз.

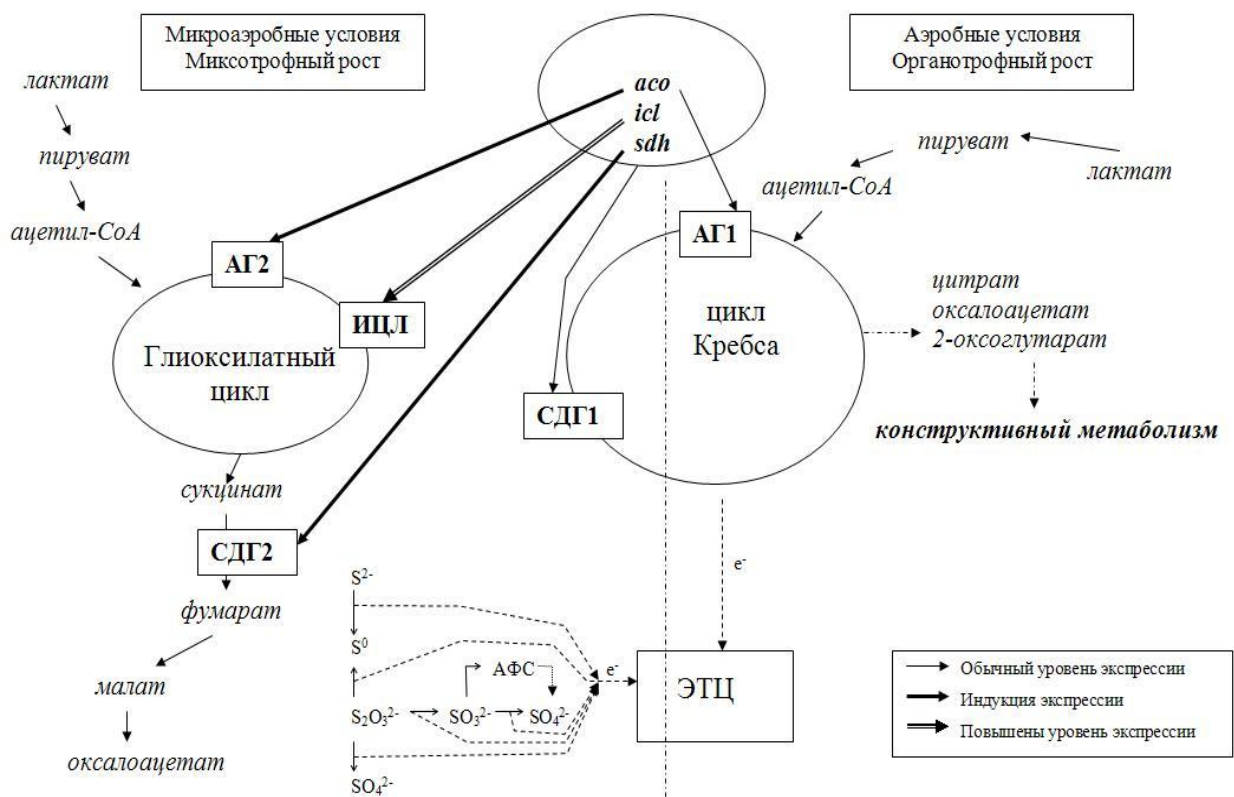


Рис. 29. Гипотетическая схема трансформации углеродного метаболизма в бактериях *Sphaerotilus natans* при смене типов питания. Обозначения: *aco* – ген аконитатгидратазы, *icl* – ген изоцитратлиазы, *sdh* – ген сукцинатдегидрогеназы, АГ1 – конститутивная форма аконитатгидратазы, АГ2 – индуцибельная форма аконитатгидратазы, ИЦЛ – изоцитратлиаза, СДГ1 – конститутивная форма сукцинатдегидрогеназы, СДГ2 – индуцибельная форма сукцинатдегидрогеназы.

Высокий относительный уровень транскриптов *aco* и *sdh* при хемолитоорганотрофном типе питания штаммов Д-501 и Д-507 свидетельствовал об участии кодируемых этими генами ферментов не только в цикле Кребса, но и в глиоксилатном пути (АГ), и в глюконеогенетической утилизации сукцината (СДГ), синтезируемого в глиоксилатном цикле.

Таким образом, на основании полученных в нашей работе данных разработана гипотетическая схема трансформации углеродного метаболизма в бактериях *Sphaerotilus natans* subsp. *Sulfidivorans* (рис.29). При смене условий культивирования и типов питания осуществляется адаптивная реакция клеточного метаболизма, обеспечивающая устойчивое функционирование этих бактерий. Индукция маркерного фермента (ИЦЛ) глиоксилатного цикла и ключевых ферментов ЦТК (АГ и СДГ) в микроаэробных условиях и при миксотрофном питании у бактерий штамма Д-501 и Д-507 осуществляется на молекулярно-генетическом уровне.

ВЫВОДЫ

1. Микроаэробные условия и присутствие восстановленных серных соединений индуцировали у *Sphaerotilus natans subsp. sulfidivorans* Д-501 хемолитоорганотрофный тип питания. Об этом свидетельствовали интенсификация окисления тиосульфата и высокая скорость функционирования ферментов сульфитферрицианидоксиоредуктазы и АФС-редуктазы, обеспечивающих диссимиляционное окисление восстановленной серы.
2. Хемолитогетеротрофия у бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 вызывалась миксотрофным питанием (добавлением тиосульфата и лактата в питательную среду) и не зависела от аэробных условий культивирования.
3. Переход к хемолитогетеротрофии у бактерий *Sphaerotilus natans* в микроаэробных условиях (штамм Д-501) и при миксотрофном типе питания (штамм Д-507) вызывал трансформацию основного углеродного метаболизма. Индукция активности маркерного фермента ИЦЛ в этих условиях свидетельствует о включении функционирования глиоксилатного цикла – важнейшего этапа глюконеогенеза.
4. Увеличение активности и изменение изоферментного состава сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы (появление дополнительных изоформ при микроаэробном культивировании (Д-501) и миксотрофном типе питания (Д-507) свидетельствуют о перестройке метаболизма и осуществлении адаптивной реакции.
5. Использование ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Sephacel позволило разделить изоформы АГ и СДГ из исследуемых бактерий и получить их высокоочищенные препараты с высокой удельной активностью. При этом наблюдали значительный выход ферментативной активности, варьиравший от 4 до 10 %.

6. Кинетические (K_m) и регуляторные (рН) характеристики дополнительных (индуцибельных) изоформ сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы имеют определенные отличия от этих показателей у конститутивных форм (функционирующих в ЦТК), что может быть обусловлено их функционированием в метаболизме глиоксилатного цикла и глюконеогенеза.
7. Хемолитоорганотрофный тип питания в микроаэробных условиях (штамм Д-501) и миксотрофное питание (штамм Д-507) индуцируют в исследуемых бактериях экспрессию гена *icl*. Высокий уровень транскриптов *icl* обуславливает биосинтез маркерного фермента глиоксилатного цикла, который играет конструктивную функцию в данных условиях.
8. Высокий относительный уровень транскриптов *aco* и *sdh* при хемолитоорганотрофном типе питания штаммов Д-501 и Д-507 свидетельствует об участии кодируемых этими генами ферментов не только в цикле Кребса, но и в глиоксилатном пути (АГ) и глюконеогенетической утилизации сукцината (СДГ).
9. Разработана гипотетическая схема трансформации углеродного метаболизма в бактериях *Sphaerotilus natans* subsp. *Sulfidivorans*. При смене условий культивирования и типов питания осуществляется адаптивная реакция клеточного метаболизма, обеспечивающая устойчивое функционирование этих бактерий. Индукция маркерного фермента (ИЦЛ) глиоксилатного цикла и ключевых ферментов ЦТК (АГ и СДГ) в микроаэробных условиях и при миксотрофном питании у бактерий штамма Д-501 и Д-507 осуществляется на молекулярно-генетическом уровне.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Белоусова Е.В. Таксономия и новые аспекты экофизиологии и метаболизма бактерий рода *Sphaerotilus*: автореф. дис. на соискание учёной степени канд. биол. наук / Е.В. Белоусова. – М., 2011. – 24 с.
2. Березов Т.Т. Биологическая химия: учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. - 3-е изд., перераб. и доп. - М. : Медицина, 1998. - 704с.
3. Блюменфельд Л.А. Единичные циклы прямой ферментативной реакции на примере МДГ/ Л.А. Блюменфельд, П.Г. Плешанов // Биофизика. – 1986. – Т. 30, вып. 5. – С. 760-763.
4. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкей - М.: Мир, 1982. - 448 с.
5. Грабович М.Ю. Биоразнообразие бесцветных серобактерий: таксономия, метаболизм и его регуляция: дисс. доктора биол. наук / М.Ю. Грабович. – Саратов, 2005. – 308 с.
6. Диксон М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб – М. : Мир, 1982. – Т. 3. – 216 с.
7. Епринцев А.Т. Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов // Воронеж: Из-во Воронеж. ун-та, 1999. – 192 с.
8. Епринцев А.Т. Глиоксилатный цикл. Универсальный механизм адаптации / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов, М.Ю. Шевченко // Москва: Академкнига. – 2007. – 231 с.
9. Епринцев А.Т. Идентификация и исследование экспрессии генов / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов, Д.Н. Федорин // Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2008. – 63 с.
10. Епринцев А.Т. Молекулярные аспекты формирования олигомерной структуры сукцинатдегидрогеназы /А.Т. Епринцев, Д.Н. Федорин, Н.В.

- Селиванова //Воронеж: Центрально-Черноземное книжное издательство. – 2016. - 263 с.
11. Землянухин А.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений / А.А. Землянухин, Л.А. Землянухин // ВГУ. – Воронеж, 1996. – 188с.
12. Келети Т. Основы ферментативной кинетики / Т. Келети. – М. : Мир, 1990. – 350 с.
13. Климова М.А. Очистка ферментов и методы исследования их каталитических свойств / М.А. Климова, А.Т. Епринцев // Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2008. - 36 с.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин // М.: Высш. шк., 1990. – 351с.
15. Мауэр Г. Диск-электрофорез / Г. Мауэр. – М. : Мир, 1971. – 222 с.
16. Мешкова Н.П. Практикум по Биохимии / Н.П. Мешкова, С.Е. Северин - М., 1979. - 428с.
17. Миксотрофный и литогетеротрофный тип питания пресноводного штамма скользящих нитчатых серобактерий *Beggiatoa leptomitiformis* Д-402 / М.Ю. Грабович [и др.] // Микробиология. - 1998. - Т. 67, № 4. - С. 464-470.
18. Петушкова Ю.П. Ферменты, участвующие в метаболизме тиосульфата у *Thiocapsa roseopersicina* при ее росте в разных условиях / Ю.П. Петушкова, Р.Н. Ивановский // Микробиология. – 1976. – Т. 45, № 6. – С. 960-965.
19. Попов В.Н. Основы современных методов изучения нуклеиновых кислот / В.Н. Попов, А.Т. Епринцев, Д.Н. Федорин // Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2006. – 47 с.
20. Резников А.А. Методы анализа природных вод. / А.А. Резников, Е.П. Муликовская, В.Ю. Соколов // Москва: Госгеолтехиздат. – 1970. – 488 с.
21. Уильямс У.Д. Определение анионов / У.Д. Уильямс // Москва: Химия. – 1982. – 622 с.

22. Хочачка П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро. - М. : Мир. - 1988. - 568 с.
23. Экофизиология хемолитоорганотрофных сероокисляющих представителей рода *Sphaerotilus* – обитателей сульфидных источников Северного Кавказа / Е.В. Гриднева [и др.] // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – № 1. – С. 89-97.
24. Abortive assembly of succinate-ubiquinone reductase (complex II) in a ferrochelatase-deficient mutant of *Escherichia coli* / C. Nihei [et al.] // Mol Genet Genomics. - 2001. – Vol.265, No 3. – P. 394-404.
25. Absolute proteome and phosphoproteome dynamics during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe* (fission yeast) / A. Carpy [et al.] // Mol. Cell. Proteomics. – 2014. – Vol.13. – P.1925–1936.
26. Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum* / R. Gerstmeir [et al.] // J Biotechnol. – 2003. – Vol.104, No 1-3. – P.99-122.
27. Ackrell B.A. Interactions of oxaloacetate with *Escherichia coli* fumarate reductase / B.A. Ackrell, B. Cochran, G. Cecchini // Arch Biochem Biophys. - 1989. – Vol. 268, No 1. – P. 26-34.
28. A *Corynebacterium glutamicum* gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins / W. Jäger [et al.] // Arch Microbiol. – 1996. – Vol.166, No 2. – P.76-82.
29. A genome-wide resource of cell cycle and cell shape genes of fission yeast / J. Hayles [et al.] // Open Biol. – 2013. – Vol.3, No 5. - P.130053. doi: 10.1098/rsob.130053.
30. Aisen P. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. P. Aisen, C. Enns Wessling-Resnick // Int J Biochem Cell Biol. – 2001. – Vol.33. – P. 940–959.
31. Alén C. *Bacillus subtilis* aconitase is an RNA-binding protein / C. Alén, A.L. Sonenshein // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999. – Vol.96, No 18. – P.10412-10417.

32. Altinok I. Succinate dehydrogenase mutant of *Listonella anguillarum* protects rainbow trout against vibriosis / I. Altinok, E. Capkin, A. Karsi // *Vaccine*. – 2015. – Vol. 33. – P.5572-5577.
33. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes / N. Ishii [et al.] // *Nature*. – 1998. – Vol.394. – P.694-697.
34. Anaerobic expression of *Escherichia coli* succinate dehydrogenase: functional replacement of fumarate reductase in the respiratory chain during anaerobic growth / E. Maklashina [et al.] // *J Bacteriol*. – 1998. – Vol.180, No 22. – P.5989-5996.
35. Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* / D.U. Kim [et al.] // *Nat. Biotechnol*. – 2010. – Vol.28. – P.617– 623.
36. Anthony Baughn D. A mitochondrial-like aconitase in the bacterium *Bacteroides fragilis*: Implications for the evolution of the mitochondrial Krebs cycle / D. Anthony Baughn, H. Michael Malamy // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2002. – Vol.99, No 7. – P. 4662–4667.
37. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation / V. Yankovskaya [et al.] // *Science*. – 2003. – Vol.299. – P.700-704.
38. Armbruster E. H. Improved technique for isolation and identification of *Sphaerotilus* / E. H. Armbruster // *Appl. Microbiol*. – 1969. – Vol. 17. – P. 320-321.
39. Artymiuk P.J. The double life of aconitase / P.J. Artymiuk, J. Green // *Structure*. – 2006. – Vol.14, No 1. – P. 2-4.
40. Austin C.M. Aconitase-mediated posttranscriptional regulation of *Helicobacter pylori* peptidoglycan deacetylase / C.M. Austin, R.J. Maier // *J Bacteriol*. – 2013. – Vol.195, No 23. – P.5316-5322.
41. Autoregulation of *iclR*, the gene encoding the repressor of the glyoxylate bypass operon / L. Gui [et al.] // *J Bacteriol*/ - 1996. – Vol.178. – P.321–324.

42. *Bacillus subtilis* aconitase is required for efficient late-sporulation gene expression / A.W. Serio [et al.] // *J Bacteriol.* – 2006. – Vol.188, No 17. – P.6396-6405.
43. Bairoch A. The ENZYME database in 2000 / A. Bairoch / *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol.28, No 1. – P.304-305.
44. Baothman O.A. Characterization of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium aconitase* / O.A. Baothman, M.D. Rolfe, J. Green J. // *Microbiology.* – 2013. – Vol.159, No 6. – P.1209-1216.
45. Bennett M.J. 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly / M.J. Bennett, M.P. Schlunegger, D. Eisenberg // *Protein Sci.* - 1995. – Vol.4, No 12. – P. 2455-2468.
46. Berney M. Unique flexibility in energy metabolism allows mycobacteria to combat starvation and hypoxia / M. Berney, G.M. Cook // *PLoS One.* – 2010. – Vol.5, No 1. - doi: 10.1371/journal.pone.0008614.
47. Binding of the Covalent Flavin Assembly Factor to the Flavoprotein Subunit of Complex II / Elena Maklashina [et al.]// *J Biol Chem.* – 2016. – Vol.291, No 6. – P. 2904–2916
48. Biochemical and biophysical characterization of succinate: Quinone reductase from *Thermus thermophilus* / Olga Kolaj-Robin [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* – 2011. – Vol. 1807, No 1. - P. 68-79.
49. Biochemical and spectroscopic characterization of *Escherichia coli* aconitases (AcnA and AcnB) / P.A. Jordan [et al.] // *Biochem J.* – 1999. – Vol.344, No 3. – P.739-746.
50. Bowen T.J. Some properties of the rhodanese system of *Thiobacillus denitrificans* / T.J. Bowen, P.J. Butler, F.C. Happold // *Biochem J.* – 1965. – Vol.97. – P. 65 –657.
51. Bradley A.S. Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway / A.S. Bradley, W.D. Leavitt, D.T. Johnston // *Geobiology.* – 2011. – Vol.9, No 5. – P.446-457.

52. Cecchini G. Function and structure of complex II of the respiratory chain / G. Cecchini // *Annu Rev Biochem.* – 2003. – Vol.72. – P.77-109.
53. Characterization, gene cloning and expression of isocitrate lyase involved in the assimilation of one-carbon compounds in *Hyphomicrobium methylovorum* GM2 / Y.I. Tanaka [et al.] // *Eur J Biochem.* – 1997. - Vol.249, No 3. – P. 820-825.
54. Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* / Höner [et al.] // *J Bacteriol.* - 1999. – Vol.181, No 23. – P. 7161-7167.
55. Characterization of a flavocytochrome that is induced during the anaerobic respiration of Fe³⁺ by *Shewanella frigidimarina* NCIMB400 / P.S. Dobbin [et al.] // *Biochem J.* - 1999. – Vol.342, No 2. – P. 439-448.
56. Characterization of a Functional Role of the *Bradyrhizobium japonicum* Isocitrate Lyase in Desiccation Tolerance. Jeong-Min Jeon [et al.] // *J Mol Sci.* - 2015. – Vol.16, No 7. – P. 16695–16709.
57. Cloning and sequence analysis of the gene encoding isocitrate lyase from *Rhodococcus fascians* / D. Vereecke [et al.] // *J Gene.* – 1994. – Vol.145, No 1. – P.109-114.
58. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate dehydrogenases (ICD-1 and ICD-2) reveals differences in coenzyme affinity, oligomeric state, pH tolerance and phylogenetic affiliation / S. Banerjee [et al.] // *BMC Biochem.* – 2005. – P. 6–20. - doi: [10.1186/1471-2091-6-20](https://doi.org/10.1186/1471-2091-6-20)
59. Compensatory phosphorylation of isocitrate dehydrogenase. A mechanism for adaptation to the intracellular environment / D.C. LaPorte [et al.] // *Jr J Biol Chem.* – 1985. – Vol.260, No 19. – P.10563-10568.
60. Complex II from phototrophic purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* displays rhodoquinol-fumarate reductase activity / H. Miyadera [et al.] // *Eur J Biochem.* 2003. – Vol.270, No 8. – P. 1863-1874.

61. Cooper T.G. Mitochondria and Glyoxysomes from Castor Bean Endosperm. Enzyme Constituents and Catalytic Capacity / T.G. Cooper, H.J. Beevers // J. Biol. Chem. -1969. - Vol. 244. - P. 3507–3513.
62. Corynebacterium glutamicum sdhA encoding succinate dehydrogenase subunit A plays a role in cysR-mediated sulfur metabolism / D.S. Lee [et al.] // Appl Microbiol Biotechnol. – 2014. – Vol.98, No 15. – P.6751-6759.
63. Coupling of electron transfer and protein dynamics. In "Biological Electron Transfer Chains: Genetic, Composition and Mode of Operation", G.V.Canters and E.Vijgenboom (eds) / A.I. Kotelnikov [et al.] // Kluwer Academic Publishers NATO, 1998. — P. 3–8.
64. Crystal structures of aconitase with trans-aconitate and nitrocitrate bound. / H. Lauble [et al.] // Biochemistry. - 1992. – Vol.31. – P. 2735-2748.
65. Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase / J. Dupuy [et al.] // Structure. - 2006. – Vol.14, No 1. – P.129-139.
66. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II / F. Sun [et al.] // Cell. - 2005. – Vol.121, No 7. – P.1043-1057.
67. Crystal structure of the *Pyrococcus horikoshii* isopropylmalate isomerase small subunit provides insight into the dual substrate specificity of the enzyme / Y. Yasutake [et al.] // J Mol Biol. - 2004. – Vol.344, No 2. – P.325-333.
68. Cunningham L. Transcriptional regulation of the aconitase genes (acnA and acnB) of *Escherichia coli* / L. Cunningham, M.J. Gruer, J.R. Guest // Microbiology. – 1997. – Vol.143. – P. 3795–3805.
69. Dahl C. Sulfur oxidation in prokaryotes / C. Dahl, C.G. Friedrich, A. Kletzin // Encyclopedia of Life Sciences (ELS). – 2008. – 39 p.
70. Defining a direction: electron transfer and catalysis in *Escherichia coli* complex II enzymes / E. Maklashina, G. Cecchini, S.A. Dikanov // Biochim Biophys Acta. -2013. – Vol.1827, No 5. – P. 668-678.
71. Determination of an optimal potential window for catalysis by E. coli dimethyl sulfoxide reductase and hypothesis on the role of Mo(V) in the

- reaction pathway / K. Heffron [et al.] // *Biochemistry*. - 2001. - Vol. 40, No 10. - P.3117-3126.
72. Dibrov E. The *Saccharomyces cerevisiae* TCM62 gene encodes a chaperone necessary for the assembly of the mitochondrial succinate dehydrogenase (complex II) / E. Dibrov, S. Fu, B.D. Lemire // *J Biol Chem*. – 1998. – Vol.273, No 48. – P. 32042-32048.
73. DNA flexibility of the UP element is a major determinant for transcriptional activation at the *Escherichia coli* acetate promoter. D. Negre [et al.] // *Nucleic Acids*. – 1997. – Vol.25. – P. 713–718.
74. Dominance of sulfur-fueled iron oxide reduction in low-sulfate freshwater sediments / C.M. Hansel [et al.] // *PM ISME J*. - 2015 Vol.9, No 11. – P.2400-2412.
75. Dual function of Sdh3 in the respiratory chain and TIM22 protein translocase of the mitochondrial inner membrane / N. Gebert [et al.] // *Mol Cell*. - 2011. – Vol. 44, No 5. – P. 811-818.
76. Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in *Mycobacterium tuberculosis* / T.A. Gould [et al.] // *Mol Microbiol*. - 2006. – Vol. 61, No 4. – P. 940-947.
77. Dunn M.F. Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis / M.F. Dunn, J.A. Ramírez-Trujillo, I. Hernández-Lucas // *Microbiology*. – 2009. – Vol.155, No 10. – P. 3166-3175.
78. *E. coli* aconitase B structure reveals a HEAT-like domain with implications for protein-protein recognition / C.H. Williams [et al.] // *Nat Struct Biol*. – 2002. – Vol.9, No 6. – P.447-452.
79. Effects of nitrate respiration on expression of the Arc-controlled operons encoding succinate dehydrogenase and flavin-linked L-lactate dehydrogenase / S.I. Iuchi [et al.] // *J Bacteriol*. – 1994. – Vol.176, No 6. – P.1695-1701.

80. Electron-Transfer Pathways in the Heme and Quinone-Binding Domain of Complex II (Succinate Dehydrogenase) / F. Robert [et al.] // *Biochemistry*. – 2014. – Vol.53, No 10. – P. 1637–1646.
81. Engineering a synthetic anaerobic respiration for reduction of xylose to xylitol using NADH output of glucose catabolism by *Escherichia coli* AI21 / Iverson A [et al.] // *BMC Syst Biol.* - 2016. - P.10-31. doi: 10.1186/s12918-016-0276-1.
82. *Escherichia coli* aconitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of sodA expression / Y. Tang [et al.] // *J Microbiology*. – 2002. – Vol.148, No 4. – P.1027-1037.
83. *Escherichia coli* succinate dehydrogenase variant lacking the heme b / Q.M. Tran [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – Vol.104, No 46. – P. 18007-18012.
84. Essentiality of succinate dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis* and its role in the generation of the membrane potential under hypoxia / I. Pecsì [et al.] // *MBio.* -2014. – Vol.5, No 4. – P.3316-3319.
85. Expression and properties of the glyoxysomal and cytosolic forms of isocitrate lyase in *Amaranthus caudatus* L. / A.T. Eprintsev [et al.] // *J Plant Physiol.* – 2015. – Vol.1, No 181. – P. 1-8.
86. Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of aconitase in maize scutellum / A.T. Eprintsev [et al.] // *J Plant Physiol.* – 2015. – Vol.1, No 181. – P.14-19.
87. [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Escherichia coli* fumarate reductase by site-directed mutagenesis / A. Manodori [et al.] // *Biochemistry*. – 1992. - Vol.31, No 10. – P. 2703-2712.
88. Fisher M.A. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes / M.A. Fisher, B.B. Plikaytis, T.M. Shinnick // *J Bacteriol.* - 2002. – Vol.184, No 14. – P. 4025-4032.

89. Fumarate reductase activity of bovine heart succinate-ubiquinone reductase. New assay system and overall properties of the reaction / V.G. Grivennikova [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. - 1993. – Vol.1140, No 3. – P. 282-292.
90. Fumarate reductase and succinate oxidase activity of *Escherichia coli* complex II homologs are perturbed differently by mutation of the flavin binding domain. / E. Maklashina [et al.] // *J Biol Chem*. - 2006. – Vol.281, No 16. – P. 11357-11365.
91. Functional Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* Acetate Metabolism Genes *aceA*, *SMc00767*, and *glcB* / J. A. Ramírez-Trujillo [et al.] // *J Bacteriol*. – 2007. – Vol.189, No 16. – P. 5875–5884.
92. Frigaard N.-U. Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria / N.-U. Frigaard, C. Dahl // *Adv. Microb. Physiol*. – 2009. – Vol.54. - P.103–200.
93. Gaudy E. Factors affecting filamentous growth of *Sphaerotilus natans* / E. Gaudy, R.S. Wolfe // *Appl Microbiol*. – 1961. – Vol. 9. – P. 580-584.
94. Geometric restraint drives on- and off-pathway catalysis by the *Escherichia coli* menaquinol:fumarate reductase / T.M. Tomasiak [et al.] // *J Biol Chem*. – 2011. – Vol.286, No 4. – P. 3047-3056.
95. Green J., Paget M.S. Bacterial redox sensors / J. Green, M.S. Paget // *Nat Rev Microbiol*. – 2004. – Vol.2. – P. 954–966.
96. Gruer M.J. The aconitase family: three structural variations on a common theme / M. J. Gruer, P. J. Artymiuk & J. R. Guest // *Trends in Biochemical Sciences*. – 1997. – Vol.22, No 1. – P. 3–6.
97. Hagerhall C. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme / C. Hagerhall // *Biochim Biophys Acta*. - 1997. - Vol.1320. - P.107-141.
98. Hentze M.W. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide and oxidative stress / M.W. Hentze, L.C. Kuhn // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1996. – Vol.93. – P. 8175–8182.

99. Holmgren E. Role of heme in synthesis and membrane binding of succinic dehydrogenase in *Bacillus subtilis* / E. Holmgren, L. Hederstedt, L. Rutberg // J Bacteriol. – 1979. – Vol.138, No 2. – P. 377-382.
100. HOQNO interaction with cytochrome b in succinate:menaquinone oxidoreductase from *Bacillus subtilis* / Irina A. Smirnova [et al.] // FEBS Letters. – 1995. – Vol.359 – P. 23-26.
101. Identification of genes regulated by changing salinity in the deep-sea bacterium *Shewanella* sp. WP3 using RNA arbitrarily primed PCR / S .Li [et al.] // Extremophiles. – 2006. – Vol.10, No 2. – P. 97-104.
102. Identification of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase required for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* on acetate, acyclic terpenes and leucine / A.L. Díaz-Pérez [et al.] // FEMS Microbiol Lett. – 2007. – Vol.269, No 2. – P.309-316.
103. Identification of RNA-binding surfaces in iron regulatory protein-1 / P. Kaldy [et al.] // EMBO J. - 1999. – Vol.18, No 21. – P.6073-6083.
104. Idnurm A. Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*) / A. Idnurm, B.J. Howlett // Eukaryot Cell. - 2002. – Vol.1, No 5. – P. 719-724.
105. Imlay J.A. A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli* / J.A. Imlay // J.Biol.Chem. - 1995. - Vol. 270. – P.19767-19777.
106. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms / A. Chacinska [et al.] // Cell. - 2009. – Vol.138, No 4. – P. 628-644.
107. Interaction between Sox proteins of two physiologically distinct bacteria and a new protein involved in thiosulfate oxidation / C. Welte [et al.] // FEBS Lett. – 2009. – Vol.583. – P. 1281–1286.
108. Iron regulatory factor expressed from recombinant baculovirus: conversion between the RNA-binding apoprotein and Fe-S cluster containing aconitase /A. Emery-Goodman [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1993. – Vol.21, No 6. – P.1457-1461.

109. Iron-dependent RNA-binding activity of *Mycobacterium tuberculosis* aconitase /S. Banerjee [et al.] // J Bacteriol. – 2007. – Vol.189, No 11. – P.4046-4052.
110. Isocitrate lyase from higher plants / E. Giachetti [et al.] // Phytochemistry. -1987. –Vol.26, No 9. – P. 2439–2446.
111. Isocitrate lyase from *Mycobacterium tuberculosis* promotes survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophage by suppressing cell apoptosis / J.M. Li [et al.] // Chin Med J (Engl). - 2008. – Vol.121, No 12. – P. 1114-1119.
112. Isolation and chemical composition of the sheath of *Sphaerotilus natans* / M. Takeda [et al.] // Biosci Biotechnol Biochem. – 1998. – Vol. 62, No 6. – P. 1138-1143.
113. Ithoheterotrophic growth and electron transfer chain components of the filamentous gliding bacterium *Leucothrix mucor* DSM 2157 during oxidation of sulfur compounds / M.Yu. Grabovich [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. - 1999. - Vol. 178. - P. 155-161.
114. Iverson T.M. Structural basis for malfunction in complex II / T.M. Iverson, E. Maklashina, G.J. Cecchini //J Biol Chem. – 2012. – Vol.287, No 42. – P.35430-35438.
115. Jenkins D. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and forming / D. Jenkins, M.G. Richard, G.T. Daigger // 2nd ed. Lewis Publishers, Chelsea, Mich. - 1993. – 305 p.
116. Karlekar K. Salt mediated changes in some enzymes of carbohydrate-metabolism in halotolerant *Cladosporium sphaerospermum* / K. Karlekar, T.V. Parekh, H.S. Chhatpar // J. Biosci. 1985. – Vol.9. – P. 197–201.
117. Kessler D. Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. / D. Kessler // FEMS Microbiol. Rev. - 2006. – Vol.30. – P. 825–840.

118. Klanner C. The chaperonin-related protein Tcm62p ensures mitochondrial gene expression under heat stress / C. Klanner, W. Neupert, T. Langer // FEBS Lett. – 2000. – Vol.470, No 3. – P. 365-369.
119. Kondo R. Rapid enumeration of sulfate-reducing bacteria from aquatic environments using real-time PCR / R. Kondo, K. Shigematsu, J. Butani // Plankton Benthos Res. – 2008. – Vol.3. – P.180–183.
120. Ko Y.H. Alkylation of isocitrate lyase from *Escherichia coli* by 3-bromopyruvate / Y.H. Ko, B.A. McFadden // Arch Biochem Biophys. - 1990. – Vol.278, No 2. – P. 373-380.
121. Kornberg H.L. Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle / H.L. Kornberg, H.A. Krebs // Nature – 1957. – Vol. 179. – P. 988-991.
122. Kurland C.G. Origin and evolution of the mitochondrial proteome / C.G. Kurland, S.G. Andersson // Microbiol Mol Biol Rev. – 2000. – Vol.64, No 4. – P.786-820.
123. Lancaster C.R. A third crystal form of *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase reveals domain closure at the site of fumarate reduction / C.R. Lancaster, R. Gross, J. Simon // Eur J Biochem. - 2001. – Vol.268, No 6. – P. 1820-1827.
124. Lancaster C.R. The di-heme family of respiratory complex II enzymes / C.R. Lancaster // Biochim Biophys Acta. – 2013. – Vol.1827, No 5. – P.679-687.
125. Lancaster C.R. Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures / C.R. Lancaster, A. Kroger //Biochim Biophys Acta, - 2000. - Vol.1459. – P. 422-431.
126. Lancaster C.R. Succinate:quinone oxidoreductases--what can we learn from *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase? / C.R. Lancaster // FEBS Lett. – 2001. – Vol.504, No 3. – P.133-141.
127. Lancaster C.R. Succinate:quinone oxidoreductases: an overview / C.R. Lancaster //Biochim Biophys Acta. – 2002. – Vol.1553. - P. 1-6.

128. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. - 2001. - Vol. 25. - P. 402–408.
129. Maklashina E. Anaerobic expression of *Escherichia coli* succinate dehydrogenase: functional replacement of fumarate reductase in the respiratory chain during anaerobic growth / E. Maklashina, D.A. Berthold, G. Cecchini // *J. Bacteriol.* - 1998. - Vol.180. - P. 5989-5996.
130. Maklashina E. Comparison of catalytic activity and inhibitors of quinone reactions of succinate dehydrogenase (Succinate-ubiquinone oxidoreductase) and fumarate reductase (Menaquinol-fumarate oxidoreductase) from *Escherichia coli* / E. Maklashina, G. Cecchini // *Arch Biochem Biophys.* – 1999. – Vol.369, No 2. – P. 223-232.
131. Maloy S.R. Elevated levels of glyoxylate shunt enzymes in *Escherichia coli* strains constitutive for fatty acid degradation / S.R. Maloy, M. Bohlander, W.D. Nunn // *J Bacteriol.* – 1980. – Vol. 143, No 2. – P.720-725).
132. McFadden B.A. Itaconate, an isocitrate lyase-directed inhibitor in *Pseudomonas indigofera* / B.A. McFadden, S.J. Purohit / *J Bacteriol.* - 1977. – Vol.131, No 1. – P. 136-144.
133. Mechanism for the hydrolysis of a sulfur–sulfur bond based on the crystal structure of the thiosulfohydrolase SoxB / V.J. Sauvé [et al.] // *Biol. Chem.* – 2009. – Vol.284. – P. 21707–21718.
134. Moderate oxygen depletion as a factor favouring the filamentous growth of *Sphaerotilus natans* / Seder-Colomina M. [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek.* - 2015. - V.107, No 5. - P.1135-1144.
135. Molecular analysis of the diversity of the sulfide : quinone reductase (sqr) gene in sediment environments / V.H. Pham [et al.] // *Microbiology.* – 2008. – Vol.154, No 10. – P.3112-3121.

136. Morris H.E. Quantitative determination of elemental sulfur in aromatic hydrocarbons / H.E. Morris, R.F. Lacombe, W.H. Lane // *Anal Chem.* – 1948. – Vol. 20. – P. 1037– 1039.
137. Munoz-Elias E.J. Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence / E.J. Muñoz-Elías, J.D. McKinney // *Nat Med.* - 2005. – Vol.11, No 6. – P. 638-644.
138. Mutation of the heme axial ligand of *Escherichia coli* succinate-quinone reductase: implications for heme ligation in mitochondrial complex II from yeast / E. Maklashina [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* - 2010. – Vol.1797, No 6-7. – P. 747-754.
139. New proteins involved in sulfur trafficking in the cytoplasm of *Allochromatium vinosum* / Y. Stockdreher [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289. – P. 12390–12403.
140. 3-nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme / L.S. Huang [et al.] // *J Biol Chem.* - 2006. – Vol.281, No 9. – P. 5965-5972.
141. Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* Is Composed of 12 Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit / Jorge Morales [et al.] // *J Biol Chem.* 2009. – Vol.284, No 11. – P. 7255–7263.
142. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* / A. Matsuyama [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2006. – Vol.24. – P.841–847.
143. Ornstein L. Disc Electrophoresis I, Background and Theory / L. Ornstein, B.J. Davis // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1964. – Vol.121, No 2. – P. 321-349.
144. Overexpression of isocitrate lyase is an important strategy in the survival of *Pseudomonas fluorescens* exposed to aluminum / R. Hamel [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2004. – Vol.317, No 4. – P. 1189-1194.

145. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? / C.G. Friedrich [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol.67. – P. 2873–2882.
146. Oyedotun K.S. Identification of the heme axial ligands in the cytochrome b562 of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase / K.S. Oyedotun, P.F. Yau, B.D. Lemire // *J. Biol. Chem.* – 2004. - Vol.279. – P. 9432-9439.
147. Oyedotun K.S. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies / K.S. Oyedotun, B.D. Lemire // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol.279. – P. 9424-9431.
148. Oyedotun K.S. The *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase does not require heme for ubiquinone reduction / K.S. Oyedotun, C.S. Sit, B.D. Lemire // *Biochim Biophys Acta.* - 2007 Dec. – Vol.1767, No 12. – P. 1436-1445.
149. Park S.J. Regulation of succinate dehydrogenase (sdhCDAB) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: role of ArcA and Fnr / S.J. Park, C.P. Tseng, R.P. Gunsalus // *Mol Microbiol.* – 1995. – Vol.15, No 3. – P.473-482.
150. Peck H.D. Studies on adenosine 5'-phosphosulfate reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* and *Thiobacillus thioparus* /H.D. Peck, T. Deacon, J.T. Davidson // The assay and purification. *Biochim Biophys Acta.* – 1965. – Vol.96. – P.429–446.
151. Pfennig N.D. Uber das vitamin B₁₂ - bedurfuis phototropher Schwefelbakterien / N.D. Pfennig, K.D. Lippert // *Arch. microbiol.* – 1966. – Vol. 55, № 1. – P. 245–256.
152. Phototrophic sulfide oxidation: environmental insights and a method for kinetic analysis / T.E. Hanson [et al.] // *Front Microbiol.* – 2013. - doi: [10.3389/fmicb.2013.00382](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00382)

153. Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge / T. Kanagawa [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, No 11. - P. 5043-5052.
154. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration / M. Wagner [et al.] // *J Bacteriol.* – 1998. – Vol.180, No 11. – P.2975-2982.
155. Pokorna D. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology / D. Pokorna, J. Zabranska // *Biotechnol Adv.* – 2015. – Vol. 33, No 2. – P.1246-1259.
156. Possible occurrence and role of an essential histidyl residue in succinate dehydrogenase / S.B. Vik [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1981. – Vol. 78, No 11. – P. 6749-6753.
157. Post-transcriptional regulation of bacterial motility by aconitase proteins / Y. Tang [et al.] // *J Mol Microbiol.* – 2004. – Vol.51, No 6. – P.1817-1826.
158. Production, characterization and determination of the real catalytic properties of the putative 'succinate dehydrogenase' from *Wolinella succinogenes* / H.D. Juhnke [et al.] // *Mol Microbiol.* - 2009. – Vol.71. – P. 1088-1110.
159. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent / O.H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 1951. - V. 193. - P. 265–275.
160. Purification and characterization of the first archaeal aconitase from the thermoacidophilic *Sulfolobus acidocaldarius* / H.I. Uhrigshardt [et al.] // *Eur J Biochem.* – 2001. – Vol.268, No 6. – P.1760-1771.
161. Purification, characterization and crystallization of menaquinol:fumarate oxidoreductase from the green filamentous photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* / Yueyong Xin [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta.* - 2009. – Vol.1787. – P. 86–96.

162. Purification and properties of an enzyme capable of degrading the sheath of *Sphaerotilus natans* / M.Takeda [et al.] // *IAppl Environ Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, No 11. – P. 4998-5004.
163. Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes in proliferating and quiescent cells / S. Marguerat [et al.] // *Cell.* – 2012. – Vol.151. – P.671– 683.
164. Reeves H.C. Determination; of isocitrate lyase activity in polyacrylamide gels / H.C. Reeves, M.J. Volk // *Anal. Biochem.* - 1972. - Vol. 48, №2. - P. 437-441.
165. Regulation of the Glyoxylate Bypass Operon: Cloning and Characterization of iclr / Alden Sunnarborg [et al.] // *Journal of bacteriology.* – 1990. – P. 2642-2649.
166. Reinscheid D.J. Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme / D.J. Reinscheid, B.J. Eikmanns, H.J. Sahm // *J Bacteriol.* – 1994. – Vol.176, No 12. – P.3474-3483.
167. Robinson K.M. Covalent attachment of FAD to the yeast succinate dehydrogenase flavoprotein requires import into mitochondria, presequence removal, and folding / K.M. Robinson, B.D. Lemire // *J. Biol. Chem.* - 1996. - Vol. 271. - P. 4055-4060.
168. Role of the Transcriptional Regulator RamB (Rv0465c) in the Control of the Glyoxylate Cycle in *Mycobacterium tuberculosis* / C. Julia [et al.] // *J Bacteriol.* – 2009. – Vol.191, No 23. – P.7260–7269.
169. Rolls J.P. Effect of thiosulfate on the photosynthetic growth of *Rhodospseudomonas palustris* / J.P. Roll, E.S. Lindstrom // *J Bacteriol.* – 1967. – Vol.94, No 4. – P.860–869.
170. Roy C. Wolinella succinogenes quinol:fumarate reductase and its comparison to E. coli succinate:quinone reductase / C. Roy, D. Lancaster // *FEBS Letters.* - 2003. – Vol.555. – P. 21-28.

171. Saghbini M. Studies on the assembly of complex II in yeast mitochondria using chimeric human/yeast genes for the iron-sulfur protein subunit / M. Saghbini, P.L. Broomfield, I.E. Scheffler // *Biochemistry*. – 1994. - Vol.33, No 1. - P.159-165.
172. Salerno J.C. Electron transfer in succinate:ubiquinone reductase and quinol:fumarate reductase / J.C. Salerno // *Biochem Soc Trans*. 1991. - Vol.19, No 3. - P.599-605.
173. Salt-regulated reversible fibrillation of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyase: Concurrent restoration of structure and activity / H.I. Shukla [et al.] // *J Biol Macromol*. - 2017. – Vol.104. – P. 89-96.
174. Schäfer G. Archaeal complex II: 'classical' and 'non-classical' succinate:quinone reductases with unusual features / G. Schäfer, S. Anemüller, R. Moll // *Biochim Biophys Acta*. – 2002. – Vol.1553, No 1-2. – P.57-73.
175. Schloss J.V. Inhibition of isocitrate lyase by 3-nitropropionate, a reaction-intermediate analogue / J.V. Schloss, W.W. Cleland // *Biochemistry*. – 1982. – Vol.21, No 18. – P. 4420-4427.
176. Serio A.W. *Bacillus subtilis* aconitase is required for efficient late-sporulation gene expression / A.W. Serio, K.B. Pechter, A.L. Sonenshein // *J Bacteriol*. – 2006. – Vol. 188, No 17. – P.6396-6405.
177. Sheathed bacteria / E.G. Mulder [et al.] // *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, Md. – 1989. - Vol. 3. -1989. – P. 1994–2008.
178. Shen J.I. Role of multiple ArcA recognition sites in anaerobic regulation of succinate dehydrogenase (sdhCDAB) gene expression in *Escherichia coli* / J.I. Shen, R.P. Gunsalus // *Mol Microbiol*. – 1997. – Vol.26, No 2. – P.223-236.
179. Singh V.K. Kinetic modeling of tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass in *Mycobacterium tuberculosis*, and its application to

- assessment of drug targets / V.K. Singh, I. Ghosh // *Theor Biol Med Model.* – 2006. - doi: 10.1186/1742-4682-3-27.
180. Sorbo B. N. Rhodanase / B.N. Sorbo // *Methods in Enzymology II.* - N.Y., 1955. – P. 334–337.
181. Stage-specific isoforms of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) in mitochondria from the parasitic nematode, *Ascaris suum* / F. Saruta [et al.] // *J Biol Chem.* - 1995. – Vol.270, No 2. – P. 928-932.
182. Structural and mechanistic mapping of a unique fumarate reductase / P. Taylor [et al.] // *Nat Struct Biol.* - 1999. - Vol.6. - No 12. - P.1108-1112.
183. Structural basis for the oxidation of protein-bound sulfur by the sulfur cycle molybdohemo-enzyme sulfane dehydrogenase SoxCD / U.J. Zander [et al.] // *Biol. Chem.* – 2010. – Vol.286. – P. 8349–8360.
184. Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme / V.A. Bamford [et al.] // *EMBO J.* – 2002. – Vol.21. – P. 5599–5610.
185. Structure and function of succinate dehydrogenase and fumarate reductase / B.A.C. Ackrell [et al.] // *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* (ed Muller F.), CRC Press, Boca Raton, Florida. - 1992. - Vol.3. - P.229-297.
186. Structure and mechanism of the flavocytochrome c fumarate reductase of *Shewanella putrefaciens* MR1 / Leys D. [et al.] // *Nat. Struct. Biol.* - 1999. - V.6. – P.1113–1117.
187. Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis* / V. Sharma [et al.] // *Nat Struct Biol.* – 2000. – Vol.7, No 8. – P. 663-668.
188. Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex / T.M. Iverson [et al.] // *Science.* - 1999 Jun 18. – Vol.284, No 5422. – P. 1961-1966.

189. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli* / G. Cecchini [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* - 2002. – Vol.1553, No 1-2. – P. 140-157.
190. Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. / M. Reinartz [et al.] // *Arch Microbiol.* – 1998. – Vol.170, No 1. – P.59-68.
191. Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*: requirement for growth, periplasmic localization, and extension of gene sequence analysis / M. Schütz [et al.] // *J Bacteriol.* – 1999. – Vol.181, No 20. – P. 6516-6523.
192. Switching aconitase B between catalytic and regulatory modes involves iron-dependent dimer formation / Y.I. Tang [et al.] // *Mol Microbiol.* - 2005. – Vol.56, No 5. – P. 1149-1158.
193. Thauer R.K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria / R.K. Thauer, K. Jungermann, K. Decker // *Bacteriol Rev.* – 1977. – Vol.41, No 1. – P.100-180.
194. The cold-inducible *icl* gene encoding thermolabile isocitrate lyase of a psychrophilic bacterium *Colwellia maris* / S. Watanabe [et al.] // *Microbiology.* – 2002. – Vol.148, No 8. – P. 2579-2589.
195. The covalent attachment of FAD to the flavoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase is not necessary for import and assembly into mitochondria / K.M. Robinson [et al.] // *Eur J Biochem.* - 1994. – Vol.222, No 3. – P. 983-990.
196. The crystal structure and active site location of isocitrate lyase from the fungus *Aspergillus nidulans* / K. Britton [et al.] // *Structure.* - 2000. – Vol.8, No 4. – P. 349-362.
197. The dual origin of the yeast mitochondrial proteome / O. Karlberg [et al.] // *Yeast.* – 2000. – Vol.17, No 3. – P.170-187.

198. The quinone binding site in *Escherichia coli* succinate dehydrogenase is required for electron transfer to the heme b. / Q.M. Tran [et al.] // *J Biol Chem.* - 2006. – Vol.281, No 43. – P. 32310-32317.
199. The *rpfA* gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*, which is involved in the regulation of pathogenicity factor production, encodes an aconitase / T.J. Wilson [et al.] // *Mol Microbiol.* – 1998. – Vol.28, No 5. – P.961-970.
200. The SoxYZ complex carries sulfur cycle intermediates on a peptide swinging arm. / V.J. Sauvé [et al.] // *Biol. Chem.* – 2007. – Vol.282. – P. 23194–23204.
201. The structure and domain organization of *Escherichia coli* isocitrate lyase / K.L. Britton [et al.] // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2001. – Vol.57, No 9. – P. 1209-1218.
202. The tricarboxylic acid cycle of *Helicobacter pylori* / S.M. Pitson [et al.] // *Eur J Biochem.* – 1999. – Vol.260, No 1. – P.258-267.
203. The trinuclear iron-sulfur cluster S3 in *Bacillus subtilis* succinate:menaquinone reductase; effects of a mutation in the putative cluster ligation motif on enzyme activity and EPR properties / C. Hägerhäll [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* - 1995. - Vol. 1229, No 3. – P.356-362.
204. The unusual iron sulfur composition of the *Acidianus ambivalens* succinate dehydrogenase complex / C.M. Gomes [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 1999. - Vol. 1411, No 1. – P.134-141.
205. Two roles for aconitase in the regulation of tricarboxylic acid branch gene expression in *Bacillus subtilis* / K.B. Pechter [et al.] // *J Bacteriol.* – 2013. – Vol. 195, No 7. – P.1525-1537.
206. Varghese S. Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion / S. Varghese, Y. Tang, J.A. Imlay // *J Bacteriol.* – 2003. – Vol.185, No 1. – P.221-230.

207. Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of alpha-ketoglutarate decarboxylase / J. Tian [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2005. – Vol.102, No 30. – P.10670-10675.
208. Vik S.B. Possible occurrence and role of an essential histidyl residue in succinate dehydrogenase / S. B. Vik, Y. Hatefi // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1981. - V. 78, No 11. – P. 6749-53.
209. Voltammetric studies of bidirectional catalytic electron transport in *Escherichia coli* succinate dehydrogenase: comparison with the enzyme from beef heart mitochondria / H.R. Pershad [et al.] // Biochim Biophys Acta. - 1999. - Vol.1412. - P.262–272.
210. Walker W.H. Identification of the covalently bound flavin of succinate dehydrogenase as 8-alpha-(histidyl) flavin adenine dinucleotide / W.H. Walker, T.P. Singer // J Biol Chem. - 1970. – Vol.245, No 16. – P. 4224-4225.
211. Watanabe S.I. Purification and characterization of a cold-adapted isocitrate lyase and a malate synthase from *Colwellia maris*, a psychrophilic bacterium / S.I. Watanabe, Y.Takada, N. Fukunaga // Biosci Biotechnol Biochem. - 2001. – Vol.65, No 5. – P. 1095-1103.
212. Weiner J.H. Fumarate reductase of *Escherichia coli*. Elucidation of the covalent-flavin component / J.H. Weiner, H. Dickie // J Biol Chem. – 1979. – Vol.254, No 17. – P. 8590-8593.
213. Whole-genome expression profiling of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydrogen peroxide / J.M. Jeon [et al.] // Mol Plant Microbe Interact. - 2011. – Vol. 24, No 12. – P. 1472-1481.
214. *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase-2.2-A resolution crystal structure and the E-pathway hypothesis of coupled transmembrane proton and electron transfer / C.R. Lancaster [et al.] // Biochim Biophys Acta. - 2002. – Vol. 1565, No 2. – P. 215-231.

215. Yamamoto K.I. Two different modes of transcription repression of the *Escherichia coli* acetate operon by IclR / K.I. Yamamoto, A. Ishihama // Mol Microbiol. – 2003. – Vol.47, No 1. – P.183-194.
216. Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing / N. Regev-Rudzki [et al.] //Mol Biol Cell. – 2005. – Vol. 16, No 9. – P.4163-4171.