

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет»

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор,
Епринцев Александр Трофимович

Официальные оппоненты: **Цыганков Анатолий Анатольевич**
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук (ИФПБ РАН), лаборатория биотехнологии и физиологии фототрофных организмов, заведующий.

Антипов Алексей Николаевич,
кандидат биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) Институт биохимии им. А.Н. Баха, лаборатория молекулярной инженерии, старший научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Российской академии наук».

Защита состоится 26 декабря 2017 года в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018, Воронеж, Университетская пл.,1, ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте Воронежского государственного университета: [http:// www.science.vsu.ru](http://www.science.vsu.ru).

Автореферат разослан «24» ноября 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

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, 1977). Ранее нами было показано, что малатдегидрогеназная ферментная система, участвующая в адаптации этих бактерий к смене типа питания (Епринцев и др., 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 регуляции транскрипции генов *icl*, *aco*, *sdh*, кодирующих биосинтез ферментов, которые обеспечивают

функционирование цикла Кребса и глиоксилатного пути в разных штаммах *S.natans* при смене типов аэробного культивирования и питания.

Цель и задачи исследования. Изучение регуляции ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути, их экспрессии и изменения изоферментного состава при переходе с хемогетеротрофного на хемолитоорганотрофный 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 хемогетеротрофном 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 свидетельствуют 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 и регуляторным 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 глиоксилатном цикле.
4. Разделение с помощью ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Sephacel 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 сопровождается у *S.natans* 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 VII 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, из них 6 статей и 2 тезиса.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы 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).

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), pH 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 пересевами составлял 2-3 суток.

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. Концентрация кислорода в газовой фазе в итоге составляла 3,5%. Затем вносили 1 мл на 100 мл среды инокулята бактерий. Соотношение объёмов жидкой и газовой фаз составляло 1:5 (Грабович и др., 2005).

Методы определения активности ферментов серного метаболизма. Определение ферментативной активности проводили в супернатанте из двухсуточной культуры в середине фазы экспоненциального роста. Активность сульфитоксидоредуктазы определяли спектрофотометрически (Петушкова, Ивановский, 1976). АФС-редуктазу измеряли в реакционной среде того же состава, что и для сульфитоксидазы, но с добавлением аденозинмонофосфата (АМФ – 1 мкмоль/л) (Реск, Deacon, 1965).

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 и др., 1970). SO_4^{2-} определяли хлоранитратным методом (Уильямс, 1982).

Определение активности ключевых ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла. Активность СДГ определяли спектрофотометрически (Cooper, Beevers, 1969). Интенсивность функционирования АГ измеряли при

длине волны 240 нм (Землянухин А.А., Землянухин Л.А., 1996). Определение активности изоцитратлиазы проводили при $\lambda = 324$ нм (Kornberg, Krebs, 1957). За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, образующего 1 мкмоль продукта за 1 мин при 25°C.

Проведение электрофоретических исследований. Для изучения электрофоретической подвижности и выявления множественных молекулярных форм СДГ в различных бактериальных объектах проводили разделение с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (Ornstein, Davis, 1964).

Специфическое проявление ферментов осуществляли тетразолиевым методом (СДГ и АГ) (Гааль и др., 1982; Епринцев, Климова, 2008). ИЦЛ проявляли, используя взаимодействие глиоксилата с модифицированным реагентом Шиффа (Reeves, Volk, 1972).

Получение высокоочищенных препаратов изоформ СДГ и АГ осуществляли по схеме: 1. Гомогенизация материала. 2. Гель-фильтрация ферментных препаратов на колонке с сефадексом G-25 для освобождения их от низкомолекулярных примесей. 3. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Sephacel. Десорбцию изоформ осуществляли с помощью линейного градиента KCl.

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 (Келети, 1990; Варфоломеев, Гуревич, 1999). Влияние pH на скорость ферментативной реакции определяли путем проведения серии измерений скорости ферментативной реакции при различных значениях pH.

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

Выделение суммарной клеточной РНК. Выделение суммарной клеточной РНК осуществляли реагентом ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя.

Получение кДНК. Для получения кДНК использовали реакцию обратной транскрипции с выделенной суммарной РНК с набором реактивов MULV RT kit (Евроген, Россия).

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 – tccgccagctattctggctc; обратный – gagctcgtagacgaccttg; к гену *aco*: прямой – gagggctgttatctggcg; обратный – ggatccatgaagggctcg; к гену *icl*: прямой – ctgtacttgtagcccagcg; обратный - ggtctggagcagtcgatcag.

Проведение ПЦР в реальном времени. Для выяснения изменения уровня экспрессии генов исследуемых ферментов проводили ПЦР-РВ на приборе Bio-Rad Chromo 4 (Bio-Rad, США), используя в качестве красителя SYBR Green I. Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов проводили с применением $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в 5-8 биологических повторностях, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Полученные данные обрабатывали с применением стандартных статистических методов с помощью критерия Стьюдента (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Серный метаболизм *S. natans* при разных условиях аэробного культивирования и питания. Микроорганизмы штамма Д-501 окисляли тиосульфат в микроаэробных условиях с гораздо большей скоростью, чем бактерии, культивируемые в аэробных условиях (рис. 1). Интенсификация окисления тиосульфата и высокая скорость функционирования ферментов сульфитферрицианидоксиоредуктазы и АФС-редуктазы (табл.1) свидетельствуют, что в микроаэробных условиях у *S. natans* (штамм Д-501) индуцируется хемолитоорганотрофный тип питания.

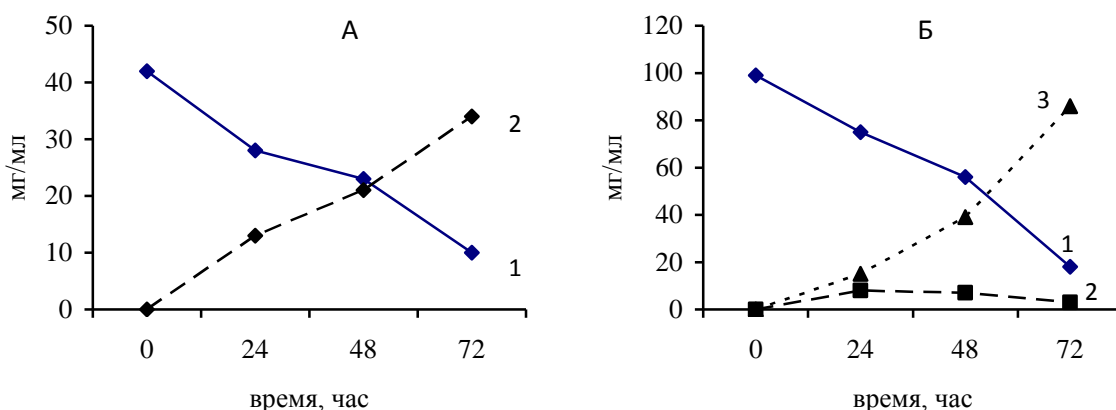


Рис.1. Влияние кислорода в газовой фазе на изменение и продукты окисления тиосульфата у штамма Д-501

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

В среду культивирования вносили 1 г/л тиосульфата натрия.

Хемолитогетеротрофия у бактерий *S. natans* штамм Д-507 вызывалась миксотрофным питанием. Добавление в питательную среду тиосульфата и лактата индуцировало окисление бактерий тиосульфата и вызывало увеличение активности ферментов серного метаболизма независимо от условий аэробного культивирования (табл. 1).

Таблица 1.

Активность ферментов серного метаболизма у разных штаммов *S. natans* subsp. *sulfidivorans* при смене аэробных условий (Е/мг белка) (n = 3, p ≤ 0,05)

Штамм	Концентрация кислорода в газовой фазе, %			
	20		5	
	Сульфит-феррицианид-оксидоредуктаза	АФС-редуктаза	Сульфит-феррицианид-оксидоредуктаза	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.

Активность ключевых ферментов ЦТК и ГЦ у штаммов при разных условиях культивирования. При хемолитогетеротрофном типе питания у бактерий штамма Д-501 в микроаэробных условиях и при миксотрофном типе питания штамма Д-507 наблюдали трансформацию основного углеродного метаболизма. Об этом свидетельствует индукция активности маркерного фермента ИЦЛ в этих условиях (табл. 2), что указывает на функционирование глиоксилатного цикла.

Получены данные, показывающие, что при миксотрофном типе питания у штамма Д-507 индуцируется глиоксилатный путь, о чем свидетельствует резкое увеличение активности фермента ИЦЛ. Увеличение функциональной активности СДГ и АГ в этих условиях указывает на перестройку углеродного метаболизма и осуществление адаптивной реакции.

Таблица 2.

Активность ключевых ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла в *S. natans* штамм Д-501 при разных условиях аэробного культивирования (n=3, p≤0,05)

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

Изоферментный состав. 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 ($R_f = 0,44-0,45$). Анализ электрофореграмм СДГ и АГ, выделенных из бактерий *S.natans* штамм Д-501 и Д-507, указывает,

что изучаемые ферменты меняли количество изоформ в зависимости от условий выращивания (рис.2).

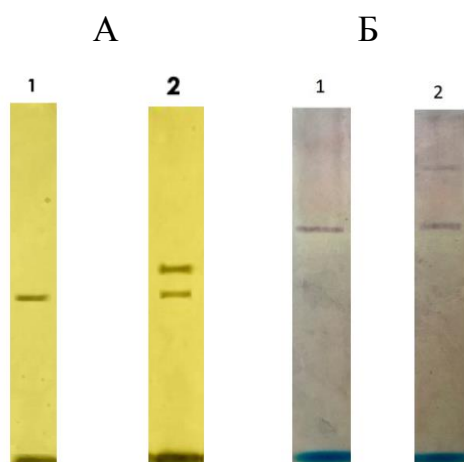


Рис. 2. Изоферментный состав аконитатгидратазы (А) и сукцинатдегидрогеназы (Б) в бактериях штамма Д-501 при разных условиях аэробного культивирования.

1 – аэробные условия;
2 – микроаэробные условия.

Разделение изоформ СДГ и АГ и получение их высокоочищенных препаратов. Использование ионообменной хроматографии в трехстадийной схеме очистки позволило осуществить получение высокоочищенных отдельных изоформ СДГ (табл.3).

Таблица 3.

Десорбция изоформ СДГ с помощью градиента концентрации КСl
(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

Препараты изоформ обладали высокой удельной активностью (9,7 и 18 Е/мг белка). При этом выход ферментативной активности СДГ составлял от 3,8 до 7,2 %. Применение такой же схемы очистки позволило получить изоформы СДГ из штамма Д-507 с удельной активностью 5,4 (СДГ1) и 6,0 (СДГ2) Е/мг белка.

С помощью трехстадийной очистки были получены изоформы аконитатгидратазы из бактерий штамма Д-501 с удельной активностью 10 и 8,3 Е/мг белка. Из штамма Д-507 выделены также 2 изоформы с удельной активностью 5,4 (АГ1) и 6,0 (АГ2) Е/мг белка.

Исследования регуляторных характеристик изоформ СДГ и АГ из бактерий штаммов Д-501 и Д-507. Анализ величин регуляторных характеристик показал (табл.4), 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.

Таблица 4.

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

Анализ полученных данных позволяет предположить, что дополнительные изоформы АГ и СДГ функционируют в новых фермент-субстратных комплексах с иными условиями микроокружения, чем в ЦТК.

Молекулярно-биологические методы идентификации генов и исследование их экспрессии. Применение специфических праймеров позволило 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 (рис.3).

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.

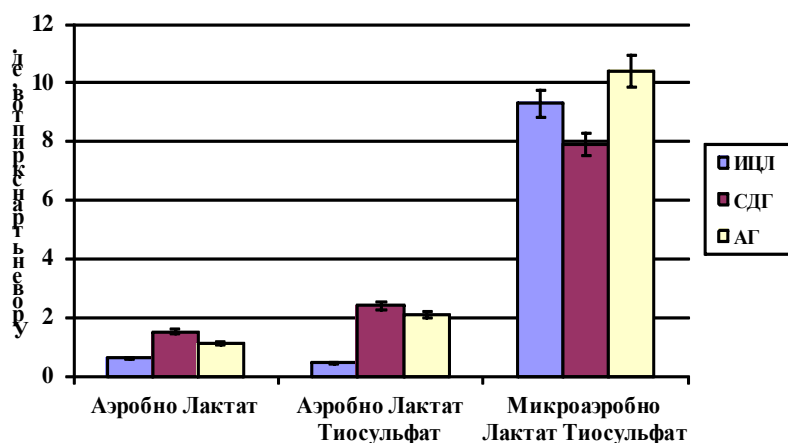


Рис. 3. Уровень экспрессии генов исследуемых ферментов у штамма Д-501 *Sphaerotilus natans* при разных условиях культивирования.

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, синтезируемого в глиоксилатном цикле (СДГ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Долгое время считалось, что бактерии *S.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). Кроме того, обнаружение в новом подвиде *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* литогетеротрофии сильно расширило представление об особенностях этих микроорганизмов. Было показано, что бактерии *S.natans* штамма 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 было показано, 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 (Лоан, 2013). Анализ данных, полученных в работе, показал, что для бактерий этого штамма практически не имеют значения условия кислородного или микроаэробного культивирования. В аэробных и микроаэробных условиях у бактерий штамма Д-507 наблюдали одинаковую 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 аэробных условий (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 к смене типов их питания. Переход к хемолитогетеротрофии у бактерий штамма Д-501 в микроаэробных условиях и при миксотрофном питании штамма Д-507 вызывал трансформацию основного углеродного метаболизма. Индукция активности маркерного фермента изоцитратлиазы при хемолитоорганотрофном питании свидетельствовала о включении функционирования глиоксилатного цикла – важнейшего этапа глюконеогенеза. Важным подтверждением индукции функционирования глиоксилатного цикла в бактериях *Sphaerotilus natans* при трансформации углеродного метаболизма служат данные по специфическому проявлению изоцитратлиазной активности в полиакриламидном геле. Полученные данные по увеличению активности и изменению изоферментного состава СДГ и АГ (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-Sephacel, 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 СДГ и АГ 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) (табл. 4). 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 зависимость от условий культивирования.

Наибольшая экспрессия *sdh* и *aco* была характерна для бактерий, выращиваемых в микроаэробных условиях или при миксотрофном типе питания. В этих условиях наблюдалось увеличение концентрации транскриптов генов, кодирующих СДГ и АГ, в несколько раз.

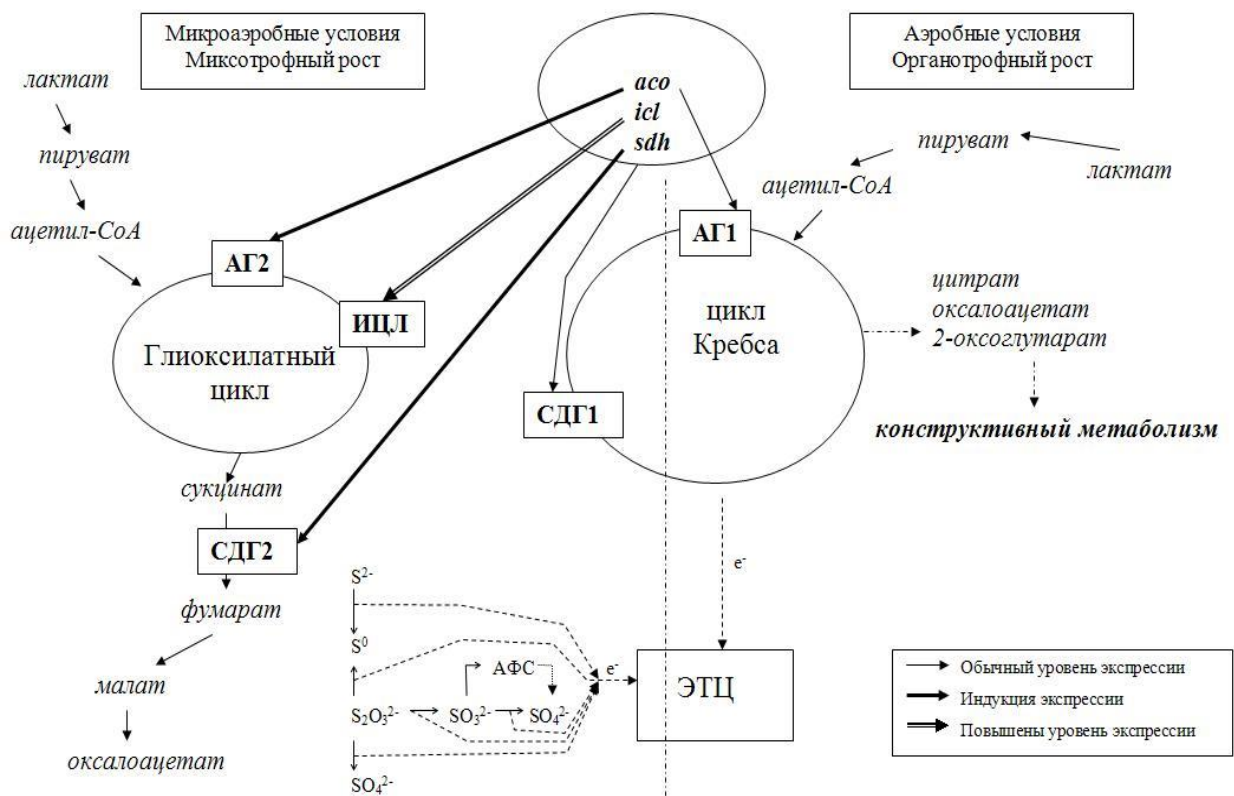


Рис. 4. Гипотетическая схема трансформации углеродного метаболизма в бактериях *Sphaerotilus natans* при смене типов питания. Обозначения: *aco* – ген аконитатгидратазы, *icl* – ген изоцитратлиазы, *sdh* – ген сукцинатдегидрогеназы, АГ1 – конститутивная форма аконитатгидратазы, АГ2 – индуцибельная форма 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, синтезируемого в глиоксилатном цикле (СДГ).

Таким образом, на основании полученных в нашей работе данных разработана гипотетическая схема трансформации углеродного метаболизма в бактериях *Sphaerotilus natans* (рис. 4). 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 штаммов Д-501 и Д-507 осуществляется на молекулярно-генетическом уровне.

ВЫВОДЫ

1. Микроаэробные условия и присутствие восстановленных серных соединений индуцировали у исследуемых бактерий штамма 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* штамма 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 *S. 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 – этапа глюконеогенеза.

4. Увеличение активности и изменение изоферментного состава СДГ и АГ (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-Sepharcel позволило разделить изоформы АГ и СДГ из исследуемых бактерий и получить их высокоочищенные препараты.
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, играющего 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 исследуемых бактериях. 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 штаммов Д-501 и Д-507 осуществляется на молекулярно-генетическом уровне.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Епринцев А.Т. Получение гомогенных препаратов изоформ сукцинатдегидрогеназы из бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 / А.Т. Епринцев, Т.Л. Ву, Н.В. Селиванова, А.Х. Хамад Ахмед // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т.48, № 6. - С.600–605.
2. Ву Т.Л., Селиванова Н.В., Федорин Д.Н., Ахмед А.Х.Х., Епринцев А.Т. Определение молекулярной массы и субъединичного строения сукцинатдегидрогеназы из бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-50747 // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегион. сб. науч. работ. Вып.14. - Воронеж, 2012. - С.47-52.
3. Селиванова Н.В., Почивалина А.Э., Хамвиталла М., Махмуд Али С., Хамад А.Х.А., Федорин Д.Н. Филогенетический анализ сукцинатдегидрогеназных генов арабидопсиса // Биология наука XXI века: 16-я международная Пущинская школа-конференция молодых учёных (Пущино, 16–21 апреля 2012 г., сб. тезисов, С.146-147).
4. Ларченков В.М. Разделение изоформ L-лактатдегидрогеназы из галоалкалофильной бактерии *Rhodovulum steppense* штамма А-20s методом ионообменной хроматографии / В.М. Ларченков, А.Х. Ахмед, Т.В. Сорокина, Ж.А. Целуйко, М.И. Фалалеева, А.Т. Епринцев// Сорбционные хроматографические процессы. – Т.15, вып.5. – Воронеж: 2015.
5. Ларченков В.М., Ахмед А.Х., Целуйко Ж.А., Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. Наличие двух типов лактатдегидрогеназ у галоалкофильной бактерии *Rhodovulum steppense* штамма А-20s // Симбиоз-Россия 2015. Материалы VII Всероссийского с международ. участием конгресса молодых ученых биологов, 5-9 октября 2015г. - Новосибирск. С.44.
6. Селиванова Н.В. Регуляция функционирования ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути в штаммах *Sphaerotilus natans* при органо- и миксотрофном типе питания / Н.В. Селиванова, А.Х.А. Ахмед, М.В. Орлова,

С.Е. Климова, А.Т. Епринцев // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация, 2017, № 2. - С.88-92.

7. Епринцев А.Т. Регуляторные и физико-химические свойства изоформ сукцинатдегидрогеназы из серобактерий *Sphaerotilus natans* штаммов Д-507 и Д-380 / А.Т. Епринцев, Н.В. Селиванова, Т.Л. Ву, А.Х.А. Ахмед // Известия РАН. Серия биологическая, 2017, № 5. - С. 493–498.

8. Ахмед А.А.Х., Орлова М.В., Климова С.Е., Селиванова Н.В., Епринцев А.Т. Разработка специфических праймеров к генам сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и изоцитратлиазы *Sphaerotilus natans* штамма Д-501 // Организация и регуляция физиолого- биохимических процессов: межрегион. сб. науч. раб. Вып. 19 . - Воронеж, 2017. - С.32-35.

Работы № 1, 4, 6, 7 опубликованы в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК.