

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Ахмед Абдуллах Хасан Ахмед «Роль ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути в адаптивной реакции бактериального метаболизма *Sphaerotilus natans* при разных типах питания»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Диссертационная работа Ахмед Абдуллах Хасан Ахмед «Роль ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути в адаптивной реакции бактериального метаболизма *Sphaerotilus natans* при разных типах питания» является актуальной прежде всего потому, что несмотря на многочисленные исследования по метаболическим трансформациям у бактерий *Sphaerotilus natans* при разных типах питания, остаются невыясненными вопросы роли ферментов центральных путей, к которым можно отнести цикл Кребса и глиоксилатный путь. Проблема изучения адаптивных реакций микроорганизмов осложняется возможным влиянием на них условий культивирования. Исследуемые в данной работе ферменты изоцитратлиаза (КФ 4.1.3.1), аконитатгидратаза (КФ 4.2.1.3) и сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.5.1) в полной мере относятся к ключевым, так как они обеспечивают регуляцию и функционирование ЦТК и ГЦ. Так показано, что изменение условий культивирования различных штаммов (Д-501 и Д-507) приводит к индукции ферментативных реакций глиоксилатного пути. Молекулярно-биологические исследования, которые проведены в рецензируемой работе, имеют важнейшее значение для понимания механизмов адаптации бактериального метаболизма в ответ на смену типов питания. В настоящий момент в научной литературе отсутствует информация о функционировании генов *icl*, *aco*, *sdh*, входящих в пул ЦТК и ГС, у бактерии *Sphaerotilus natans* при переходе от органотрофного типа питания к хемолитогетеротрофному. Анализ данных по регуляции именно этих генов при разных типах культивирования может быть сильным аргументом, свидетельствующим о путях утилизации интермедиатов у изучаемого организма.

Научно-практическая значимость работы определяется следующими фактами:

Использование комплекса современных методов исследования на примере штаммов Д-501 и Д-507 бактерий *Sphaerotilus natans* позволило обнаружить индуцирование глиоксилатного цикла в микроаэробных условиях и при миксотрофном питании. Об этом однозначно свидетельствует изоферментный состав изоцитратлиазы и высокий уровень транскриптов гена *icl*, кодирующего маркерный фермент.

Использование многостадийной схемы очистки, проведенное в диссертационной работе, позволило получить в высокоочищенном состоянии изоформы сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы из бактерии *Sphaerotilus natans*, культивируемой в микроаэробных условиях. Изучены каталитические характеристики этих энзимов, что позволило определить их участие в различных метаболических путях - цикле Кребса и глиоксилатном цикле.

Показано, что смена хемогетеротрофного питания на хемолитоорганотрофный тип питания сопровождается у *S.natans* резким увеличением концентрации транскриптов генов *aco* и *sdh*, что, по-видимому, указывает на индуцибельный характер этих генов и участие кодируемых этими генами ферментов АГ и СДГ не только в ЦТК, но и в ГЦ и в глюконеогенетической утилизации сукцината.

Диссертация Ахмед Абдуллах Хасан Ахмед построена по традиционной схеме и состоит из Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части и Обсуждения результатов, Заключение, Выводов. В диссертации дан список литературы, включающий 216 отечественных и зарубежных источников. Иллюстрационный материал включает 13 таблиц и 29 рисунков.

Во Введении автор четко формулирует актуальность работы, ее цели и задачи, представлены научная и практическая новизна диссертации, обозначены положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор составлен с использованием современных источников. В Литературном обзоре дан анализ имеющихся к настоящему времени данных о серном метаболизме, ферментативном механизме его осуществления, приведены современные данные о физико-химических и регуляторных характеристиках исследуемых ферментов (аконитатгидратаза, изоцитратлиаза и сукцинатдегидрогеназа). Автор подробно проанализировал молекулярные аспекты функционирования ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного пути. В качестве некоторого замечания, можно высказать пожелания чтобы в обзоре было заключение, которое подводит читателей к целям и задачам проводимых диссертантом исследований. Кроме того, желательно более активное использование иллюстративного материала при описании трехмерных структур изучаемых ферментов для полноценного восприятия читателем информации.

Во 2-й главе подробно описаны как сам объект, так и методы исследования. Работа проведена на бактериях *S.natans*. При этом использовались его различные штаммы. Необходимо подчеркнуть, что для выполнения исследования автор диссертации использовал широкий спектр современных методов.

В качестве замечания по этому разделу диссертациимно указать, что есть разница в методике определения активности СДГ и ее выделения (пункты 2.1.2.4.1. и 2.1.2.7.2). Отсюда вытекает вопрос СДГ мембраносвязанная или нет?

В разделе «Результаты исследований» 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.

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. Так, 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 именно индукции функционирования глиоксилатного цикла в бактериях *Sphaerotilus natans* при трансформации углеродного метаболизма служат данные по специфическому проявлению изоцитратлиазной активности в полиакриламидном геле.

Особую роль для понимания биохимических механизмов трансформации углеродного метаболизма у исследуемых бактерий играют данные по изучению каталитических свойств отдельно изолированных изоформ СДГ и АГ. Анализ этих данных 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).

Молекулярно-биологические методы (ПЦР в реальном времени и использование специфических праймеров) позволили выявить активную транскрипцию 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* при разных условиях культивирования выявил что, уровень транскриптов этих генов обнаруживает четкую зависимость от условий культивирования.

В качестве критического анализа:

1. Автор провел большую работу по разделению изоформ СДГ и АГ. Кроме того, эти ферменты были получены в высокоочищенном состоянии. На мой взгляд, можно было усилить изучение физико-химических характеристик этих изоформ, что могло дать новую информацию о их функциональной значимости.

2. Если получены высокоочищенные формы, то необходимо привести иллюстративные доказательства этого факта, т.е. данные электрофореза.

3. Также желательно видеть графики рН и субстратной зависимости исследуемых ферментов.

4. На мой взгляд, лучше проводить сравнительный анализ энзимограмм разных штаммов, komponуя их на одном рисунке, а не описывая по отдельности.

5. Микроорганизм выделен из умеренно термального источника, но сам фермент практически нестабилен при +4°C. Были ли исследованы температурный оптимум работы фермента и проводилась ли работа по подбору стабилизирующих агентов? Выявлены ли причины такой нестабильности?

6. В тексте имеются смысловые повторы и дублирование графиков (рис. 11 – 14 и рис. 15 – 16).

7. В работе было показано, что хемолитоорганотрофный тип питания в микроаэробных условиях (штамм Д-501) и миксотрофное питание (штамм Д-507) индуцируют в исследуемых бактериях экспрессию гена *icl*. Интересно было бы узнать мнение или предположение автора о механизме индукции экспрессии этого гена при смене типов питания и условий культивирования.

Приведенные замечания не снижают значимость работы.

Поставленные автором задачи выполнены полностью, а сама диссертационная работа представляет собой законченное научное исследование.

Автором опубликованы в научных изданиях 8 статей и тезисов, 4 из которых опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК РФ, т.е. представлены широкому слою



специалистов, занимающихся аналогичными исследованиями. Приведенные в работе выводы корректно отражают полученные автором научные результаты.

Автореферат полностью соответствует материалам диссертационной работы.

Таким образом, по актуальности проведенного исследования, новизне полученных результатов, методическому уровню и адекватности используемых экспериментальных подходов и безусловной практической значимости диссертация Ахмед Абдуллах Хасан Ахмед «Роль ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути в адаптивной реакции бактериального метаболизма *Sphaerotilus natans* при разных типах питания», полностью соответствует требованиям п.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013г. №842, предъявляемым к работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а сам автор является высококвалифицированным исследователем и заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Старший научный сотрудник  
лаборатории «Молекулярной инженерии»  
ФГУ «Федеральный исследовательский  
центр «Фундаментальные основы  
биотехнологии» Российской академии  
наук» Институт биохимии имени А.Н. Баха  
119071 Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2  
Рабочий телефон: +7 (495)954-40-08  
Адрес электронной почты: a\_antipov@hotmail.ru

Кандидат биологических наук

Подпись к.б.н, Антипова А.Ф. заверяю  
Ученый секретарь  
ФИЦ Биотехнологии РАН, к.б.н.



Антипов А.Н.

Орловский А.Ф.

« 06 » 12 2017г.