

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУН Института биохимии
и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина

Российской академии наук,

чл.-корр. РАН, А.М. Боронин

«16» ноября 2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу 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

Актуальность темы. Изучение механизмов регуляции метаболических процессов, осуществляемых в живых организмах, является важнейшим направлением биохимических исследований. Среди множества проблем данной области науки важное место занимает изучение ферментных систем, их физиолого-биохимической роли и механизмов действия. В связи с этим задача диссертационной работы А.Х. Хамад Ахмед, направленная на исследование роли ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и глиоксилатного цикла (ГЦ) в адаптивной реакции метаболизма бесцветных серных бактерий *Sphaerotilus natans* при разных типах питания, является весьма актуальной.

Новизна исследования, полученных результатов и выводов. Научная значимость и новизна работы заключаются в том, что автором была обнаружена зависимость активности ключевых ферментов ЦТК и ГЦ от условий культивирования разных штаммов *Sphaerotilus natans*. Об этом свидетельствуют появление высокой активности изоцитратлиазы и высокий

уровень транскриптов *icl* у бактерий в микроаэробных условиях (штамм Д-501) и при миксотрофном питании (штамм Д-507). Увеличение активности сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы сопровождалось индукцией дополнительных изоформ этих энзимов, при этом наблюдалось резкое возрастание концентрации транскриптов их генов *aco* и *sdh*. Разделение изоформ сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы позволило авторам 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).

Анализ содержания диссертации.

Диссертационная работа А.А. Хасан Ахмед изложена на 144 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение, заключения, выводов и списка литературы (216 источников, в том числе 192 на иностранных языках). Работа включает 29 рисунков, 13 таблиц.

Во введении автор обосновывает постановку разрабатываемой темы и дает краткое изложение современного состояния исследований в области биохимии адаптивной реакции метаболизма бактерий. Это позволяет ему хорошо аргументировать целесообразность основных этапов работы.

В главе “Обзор литературы” суммированы сведения об особенностях метаболизма бесцветных серных бактерий *Sphaerotilus natans*, физико-химических и регуляторных свойствах сукцинатдегидрогеназы, изоцитратлиазы и аконитатгидратазы. Приведены имеющиеся в литературе единичные сведения о молекулярных аспектах функционирования ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла. Обзор литературы читается с большим интересом. Несомненным его достоинством является суммирование и критическое осмысливание огромного массива данных, полученных в самое

последнее время в этой бурно развивающейся области исследования. Обзор литературы служит хорошим обоснованием выбора предмета исследования.

Методы исследования достаточно подробно описаны, что позволяет воспроизвести эксперименты без привлечения дополнительной литературы. В качестве объекта исследования были использованы три штамма (Д-380, Д-501 и Д-507). В работе широко применялись энзиматические методы определения активности ферментов, электрофоретические исследования в полиакриламидном геле с последующим проявлением универсальным красителем или специфическим способом. Очистка ферментов осуществлялась с помощью гель-фильтрации на сефадексах G-25 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Sephacel. Для исследований экспрессионной регуляции генов, кодирующих исследуемые ферменты, использовались современные методы полимеразной цепной реакции. При этом использовались современные приборы, позволяющие определить изменения концентрации транскриптов. В целом работа демонстрирует, что автор владеет основными методами биохимии – энзимологии, электрофореза и полимеразной цепной реакции.

Раздел «Результаты и их обсуждение» содержит несколько подразделов. В первой части работы исследован серный метаболизм у трех штаммов *Sphaerotilus natans* при разных условиях культивирования (кислородный режим и тип питания). Установлено, что микроаэробные условия и присутствие восстановленных серных соединений индуцировали у штамма Д-501 хемолитоорганотрофный тип питания. Об этом свидетельствовали интенсификация процесса окисления тиосульфата и высокая скорость функционирования ферментов сульфитферрицианидоксиоредуктазы и АФС-редуктазы, обеспечивающих диссимиляцию восстановленной серы. Хемолитогетеротрофия другого штамма (Д-507) вызывалась миксотрофным питанием (добавлением тиосульфата и лактата в питательную среду) и не зависела от обеспеченности клеток кислородом. Переход к хемолитогетеротрофии у изученных штаммов

вызывал трансформацию основного углеродного метаболизма, о чем свидетельствует высокая активность изоцитратлиазы – маркерного фермента глиоксилатного цикла. Обнаруженное увеличение функциональной активности сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы в этих условиях указывает на перестройку углеродного метаболизма и осуществление адаптивной реакции. Важным подтверждением индукции функционирования глиоксилатного цикла в клетках *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 сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы, выделенных из штаммов Д-501 и Д-507, указывает на то, что изучаемые ферменты изменяли количество изоформ в зависимости от условий культивирования.

В последующих разделах получены данные о регуляторных характеристиках изоформ сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы из штаммов Д-501 и Д-507. Для получения гомогенных препаратов была использована трехстадийная схема очистки. Из штамма Д-501 получены ферментные препараты двух изоформ сукцинатдегидрогеназы с удельной активностью 9,7 Е/мг белка и 18 Е/мг белка, а из штамма Д-507 с удельной активностью 5,4 Е/мг белка и 6 Е/мг белка. Также были получены изоформы аконитатгидратазы с удельной активностью 10 Е/мг белка и 8,3 Е/мг белка для штамма Д-501 и две изоформы с удельной активностью 5,4 (АГ1) Е/мг белка и 6,0 (АГ2) Е/мг белка для штамма Д-507.

Особое значение для подтверждения основной концепции работы имеют результаты молекулярно-биологических исследований идентификации генов и их экспрессии. Анализ данных, полученных в этом разделе диссертации, позволил установить, что 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. Кроме того, было выявлено, что 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 (аконитатгидратаза) и глюконеогенетической утилизации сукцината (сукцинатдегидрогеназа).

Обсуждение полученных результатов свидетельствует об особой роли изоформ сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в осуществлении биохимических механизмов трансформации углеродного метаболизма у бактерий *Sphaerotilus natans*. Приводится гипотетическая схема трансформации углеродного метаболизма в изучаемых бактериях, согласно которой при смене условий культивирования и типов питания осуществляется адаптивная реакция клеточного метаболизма, обеспечивающая устойчивое функционирование этих бактерий.

Рецензируемая диссертация характеризуется четкой постановкой задач, высоким методическим уровнем их решения. Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также с другими соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на семинарах, конференциях и симпозиумах. По результатам работы опубликовано 8 печатных работ, в том числе - четыре работы в журналах в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК.

Содержание автореферата и публикаций по результатам работы полностью отражает основные положения диссертации. Заключение и выводы диссертационной работы соответствуют цели и задачам проводившихся исследований, конкретны, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений.

Теоретическая и практическая значимость работы. 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 сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы и получение их препаратов в высокоочищенном состоянии открывает перспективы для их применения в научно-исследовательской работе, как вспомогательных ферментов при изучении других энзимов.

Вопросы и замечания

1. К недостаткам можно отнести опечатки, некоторые фразы в обзоре литературы представляют собой кальку с английских выражений и по-русски выглядят некорректно. В обзоре литературы сведения о свойствах сукцинатдегидрогеназы и изоцитратлиазы ограничены данными для *Aspergillus nidulans*, *Mycobacterium tuberculosis* и *Escherichia coli*. В то же время имеются сведения и для серных бактерий *Sphaerotilus natans*. Но эти замечания не портят общего в высшей степени благоприятного впечатления от работы.
2. Некоторый упрек может быть высказан автору в части нестандартного оформления главы 2. В эту главу автор включил как описание объектов и методов исследования, так и результаты и их обсуждение. Кроме того, имеются обидные опечатки в названии разделов 2.1, 2.1.2 и 2.3.
3. Использование трехстадийной очистки позволило автору получить в высокоочищенном состоянии и, самое главное, разделить изоформы сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы. К сожалению, не был проведен электрофоретический анализ полученных образцов изоферментов и поэтому трудно судить о степени очистки ферментов.
4. При обсуждении регуляторных характеристик изоформ сукцинатдегидрогеназы и аконитатгидратазы из штаммов Д-501 и Д-507

автор оперирует такими, без сомнения, важными характеристиками, как сродство фермента к субстратам и зависимостью от рН-оптимума среды. Использование других кинетических характеристик, в частности, констант ингибирования изоформ ферментов различными интермедиатами, позволило бы расширить представления о механизмах адаптивной реакции бактериального метаболизма.

Заключение

Актуальность и научно-практическая значимость работы Ахмед Абдуллах Хасан Ахмед не вызывает сомнений. Несмотря на высказанные замечания, диссертационная работа «Роль ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути в адаптивной реакции бактериального метаболизма *Sphaerotilus natans* при разных типах питания», в целом, удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям («Положение о порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской от 24.09.2013 г. № 842), а ее автор, Ахмед Абдуллах Хасан Ахмед, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия».

Отзыв был заслушан и одобрен на семинаре лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН (протокол № 2, от 16 ноября 2017 г.).

Зав. лабораторией аэробного метаболизма
микроорганизмов ИБФМ РАН
доктор биологических наук



/Моргунов И.Г.

142290, г. Пущино, проспект Науки, д. 5
ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.
Скрябина Российской академии наук
Эл. почта: morgunovs@rambler.ru
Тел./факс: +7-495-9563370

