

ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Лященко Майя Сергеевна

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА
ОЛИГОМЕРНЫХ ФОРМ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ
ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ИЗ
RHODOVULUM STEPPENSE ШТАММ А-20s
И ИХ РОЛЬ В АДАПТИВНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ СМЕНЕ ТИПОВ
ПИТАНИЯ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Епринцев А.Т.

ВОРОНЕЖ 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Физиолого-биохимические особенности метаболизма фототрофных пурпурных бактерий	14
1.1.1. Галоалкалофильные прокариоты <i>Rhodovulum steppense</i> A-20s ^T и их характеристика.....	15
1.1.2. Метаболизм пурпурных бактерий.....	18
1.2. Характеристика малатдегидрогеназной ферментной системы.....	22
1.2.1. Метаболические пути, в которых участвует малатдегидрогеназа.....	22
1.2.2. Структурная организация малатдегидрогеназы	25
1.2.3. Типы пространственной организации малатдегидрогеназы	30
1.3. Роль малатдегидрогеназы в адаптации клеточного метаболизма галофильных прокариот и системы защиты от стрессовых факторов	34
1.3.1. Адаптационные структуры геномов и протеомов галофильных микроорганизмов.....	34
1.3.2. Сравнительное исследование сольвационной оболочки МДГ и ее роль в галоадаптации прокариот.....	35
1.3.3. Анализ специфики вторичной белковой структуры галофильных МДГ.....	40
1.3.4. Кислород как фактор стресса и его роль в метаболизме аэротолерантных и анаэробных микроорганизмов.....	42
1.4. Молекулярно-биологические аспекты функционирования малатдегидрогеназного комплекса у бактерий	47
1.4.1. Молекулярные формы МДГ и их генетическая детерминация ...	47
1.4.2. Клонирование, секвенирование и экспрессия генов <i>mdh</i> бактериальных организмов.....	50
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	55
2.1. Объекты и методы исследования.....	55
2.1.1. Объект исследования	56

2.1.2. Методы исследования	55
2.1.2.1. Питательные среды для культивирования бактерий	55
2.1.2.2. Детекция ферментативной активности	56
2.1.2.3. Измерение количественного содержания белка в исследуемых образцах.....	58
2.1.2.4. Модифицированная схема ферментативной очистки.....	59
2.1.2.5. Электрофоретические методы анализа.....	60
2.1.2.5.1. Исследование электрофоретической подвижности в нативном ПААГ	60
2.1.2.5.2. Анализ гомогенности энзиматических образцов.....	60
2.1.2.5.3. Метод специфического проявления ферментов.....	61
2.1.2.5.4. Электрофоретический анализ в присутствии додецилсульфата натрия.....	61
2.1.2.6. Детекция молекулярной массы изоформ энзима	62
2.1.2.7. Масс-спектрометрический анализ МДГ	62
2.1.2.8. Исследование кинетических характеристик и регуляции активности ферментов.....	63
2.1.3. Молекулярные исследования.....	63
2.1.3.1. Выделение геномной ДНК и суммарной клеточной РНК .	63
2.1.3.3. Расчет концентрации РНК в пробе	63
2.1.3.3. Метод обратной транскрипции	64
2.1.3.4. Электрофорез нуклеиновых кислот	64
2.1.3.5. Подбор вырожденных и специфических праймеров	64
2.1.3.6. Проведение полимеразной цепной реакции	65
2.1.3.7. Секвенирование ПЦР-продукта	66
2.1.3.8. Проведение ПЦР-РВ.....	67
2.1.4. Методы вариационной статистики в процессе обработки данных	67
2.2. Полученные результаты и их обсуждение	68
2.2.1. Индукция новых изоформ МДГ у бактерий <i>Rh. steppense</i> при	

хемотрофном типе культивирования в аэробных условиях	68
2.2.2. Получение электрофоретически гомогенных препаратов изоформ МДГ	69
2.2.2.1. Многостадийная схема очистки исследуемого энзима	69
2.2.2.2. Анализ гомогенности энзиматических препаратов МДГ ..	71
2.2.2.3. Значения молекулярной массы исследуемых изоформ фермента	71
2.2.2.4. Анализ субъединичного строения молекулярных форм МДГ	71
2.2.3. Идентификация пептидов МДГ методом масс-спектрометрии ..	76
2.2.4. Некоторые кинетические характеристики и регуляция активности изоформ МДГ	78
2.2.4.1. Исследование влияния различных концентраций H^+ – ионов на энзиматическую активность	78
2.2.4.2. Расчет значений величин констант Михаэлиса-Ментен ...	78
2.2.4.3. Расчет величин констант субстратного ингибирования для изоформ МДГ	84
2.2.4.4. Действие различных концентраций катионов металлов на каталитическую активность МДГ	86
2.2.4.5. Анализ влияния ряда интермедиатов ЦТК на каталитическую активность изоформ энзима	88
2.2.4.6. Определение температурного оптимума для изоформ МДГ	94
2.2.4.7. Исследование и анализ термостабильности малатдегидрогеназы	96
2.2.5. Функционирование МДГ из <i>Rh. steppense</i> при индукции глиоксилатного цикла	98
2.2.5.1. Индукция активности изоцитратлиазы при хемотрофном типе культивирования бактерий	99
2.2.5.2. Динамика активности изоцитратлиазы	99

2.2.6. Функционирование МДГ из <i>Rh. steppense</i> в условиях оксидативного стресса	102
2.2.7. Молекулярно-биологические исследования	105
2.2.7.1. Выделение ДНК и экстракция суммарной клеточной РНК	105
2.2.7.2. Идентификация гена <i>mdh</i> у бактерий <i>Rh. steppense</i>	105
2.2.7.3. Амплификация комплиментарной ДНК.....	107
2.2.7.4. Выявление особенностей экспрессии <i>mdh</i> из <i>Rh. steppense</i> в зависимости от условий культивирования.....	109
2.2.7.5. Исследование динамики появления индуцибельных изоформ МДГ из <i>Rh. steppense</i>	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ВЫВОДЫ.....	119
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	121

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АФБ – аноксигенные фототрофные бактерии
- ГЦ – глиоксилатный цикл
- ДЭАЭ – диэтиламиноэтил
- ДТТ – дихлордифенилтрихлорметилметан
- МДГ 1, МДГ 2, МДГ 3 – октамерная, тетрамерная и димерная изоформы исследуемой малатдегидрогеназной системы из галоалкалофильных микроорганизмов *Rhodovulum steppense* A-20s
- НАД⁺ – окисленный никотинамидадениндинуклеотид
- НАДН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид
- НПБ – несерные пурпурные бактерии
- ОА – оксалоацетат
- ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
- K_i – константа субстратного ингибирования
- K_m – константа Михаэлиса
- pH – водородный показатель; характеризует концентрацию свободных ионов водорода
- PMF – масс-спектрометрический пептидный фингерпринт-анализ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Изучение различных механизмов, обеспечивающих регуляцию метаболических процессов в клетках живых организмов, представляет одно из главных направлений развития современной биохимии. Важное место среди многих вопросов и проблем данной области науки занимает исследование ферментативных систем и их функциональной роли при переключении энергетических потоков и трансформации клеточного метаболизма микроорганизмов.

Биохимические адаптации прокариот характеризуются широкими возможностями, что связано, главным образом, с функционированием их ферментных комплексов, прежде всего, энзимов ЦТК и глиоксилатного цикла. Благодаря такой высокой степени адаптационной гибкости на различных уровнях, включая молекулярный и биохимический, микроорганизмы в экстремальных условиях существования являются хорошими модельными системами для изучения механизмов адаптивных реакций клеточного метаболизма в целом, а также изменений конкретных систем ферментов.

Важное значение в сложном механизме протекания процессов адаптации имеет малатдегидрогеназный комплекс (МДГ, КФ 1.1.1.37), представленный изоферментами с различной субклеточной локализацией, принимающими участие в процессах клеточного дыхания, ЦТК, глиоксилатного и цитрамалатного циклов, в компенсации стрессов различной природы [91].

Ферменты малатдегидрогеназной системы достаточно хорошо изучены у эукариот, однако, мало информации сообщается об особенностях их структуры, функционирования, образования множественных молекулярных форм у прокариотических организмов. Тем не менее, при протекании различных метаболических реакций, обусловленных функционированием одного и того же энзима, требуется сложный механизм регуляции его

активности, к которому, например, можно отнести наличие нескольких изоферментов.

У всех эукариотических организмов МДГ присутствует как в виде митохондриальных, так и цитоплазматических изоэнзимов. Однако у прокариот, при отсутствии явления изоферментного полиморфизма, обнаружена единственная форма энзима, которая может быть представлена олигомерными полипептидами, характеризующимися различным количеством субъединиц. Для некоторых видов бактерий установлено, что участие МДГ в таких процессах, как цикл лимонной кислоты и глиоксилатный цикл, связано с появлением изоформ, возникающих путем структурных перестроек белковой молекулы [166].

Ферменты малатдегидрогеназы могут служить модельной системой для изучения эволюции, распределения белков в компартментах клеток и сравнения множественных форм, вовлеченных в различные пути клеточного метаболизма.

В связи с этим, выяснение и исследование структурной организации и функциональной роли изоформ МДГ при осуществлении процессов биохимической адаптации бактерий *Rhodovulum steppense* A-20s в условиях оксидативного стресса при хемотрофном типе культивирования представляется актуальным и позволит внести определенный вклад в изучение механизмов регуляции метаболизма прокариот при изменении факторов окружающей среды. Выявленные особенности данного вида галоалкалофильных микроорганизмов могут иметь универсальный характер и способствовать созданию целостной картины адаптации живых систем.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей диссертационной работы является исследование физико-химических и регуляторных свойств олигомерных изоформ малатдегидрогеназной ферментной системы из *Rhodovulum steppense* штамм A-20s и их роли в адаптивной реакции бактериального метаболизма при смене типа питания и условий культивирования.

Для достижения поставленной цели были сформулированы соответствующие задачи:

1. Выявить появление индуцибельных изоформ малатдегидрогеназы при переключении метаболизма *Rh. steppense*, обусловленном сменой типа питания с фототрофного при анаэробии на хемотрофный рост в кислородных условиях;
2. С помощью разработанной модифицированной схемы ферментативной очистки выделить для каждой из трех обнаруженных олигомерных форм электрофоретически гомогенный препарат МДГ в условиях аэробного хемотрофного культивирования несерных пурпурных бактерий;
3. Установить особенности структурной организации фермента с помощью денатурирующего электрофореза и масс-спектрометрического пептидного фингерпринт-анализа. Изучить каталитические свойства изоформ МДГ и регуляторные аспекты их функционирования;
4. Осуществить секвенирование ампликона гена *mdh*, кодирующего исследуемый фермент, и на основе выявленной нуклеотидной последовательности разработать и синтезировать специфические олигонуклеотидные праймеры. Провести сравнительный анализ значений величин относительных уровней транскриптов *mdh* при разных типах культивирования *Rh. steppense*;
5. Исследовать динамику активности маркерного фермента глиоксилатного цикла – изоцитратлиазы – в аэробных условиях роста бактерий в темноте;
6. Для оценки состояния антиоксидантной ферментной системы *Rh. steppense* использовать измерение значений величин активности СОД и каталазы в условиях аэробного хемотрофного типа культивирования микроорганизмов;
7. Исследовать динамику появления индуцибельных изоформ МДГ у *Rh.*

steppense при смене типа питания и условий роста бактерий;

8. Определить функциональную значимость трех олигомерных форм МДГ и их специфическую роль в ферментативном механизме трансформации метаболических потоков у объекта исследования при хемотрофном типе культивирования в присутствии O₂. Предложить гипотетическую схему участия различных изоформ энзима в осуществлении адаптивной реакции клеточного метаболизма бактерий *Rh. steppense* к стрессовым условиям.

Научная новизна. При смене типа питания впервые осуществлено выделение электрофоретически гомогенных препаратов новых индуцибельных изоформ МДГ из исследуемых бактерий в стрессовых аэробных условиях хемотрофного роста и показана важная роль структурно-функциональных изменений молекулы фермента в процессе адаптации фототрофных галоалкалофильных микроорганизмов к новым условиям культивирования. Для трех выявленных олигомерных форм МДГ также были установлены отличные физико-химические и кинетические характеристики энзима.

Исследована функциональная роль октамерной, тетрамерной и димерной изоформ фермента при перестройке метаболизма *Rh. steppense*, экспрессионная регуляция малатдегидрогеназной ферментной системы и продемонстрированы изменения интенсивности работы гена, кодирующего МДГ: многократное увеличение уровня транскрипции *mdh* в условиях аэробного роста в темноте по сравнению с данным показателем из бактерий, выращенных анаэробно на свету и характеризующихся единственной формой энзима.

Установлена динамика появления индуцибельных изоформ исследуемого фермента и обнаружена корреляция полученных данных с результатами измерения содержания мРНК для гена *mdh* и каталитической активности МДГ в зависимости от времени культивирования микроорганизмов.

Научные положения настоящей диссертационной работы способствуют углублению и расширению современных представлений о механизмах адаптации бактериальных клеток при изменении типов питания и трансформации ферментативных метаболических реакций в новых условиях культивирования.

Практическая значимость представленной диссертационной работы определяется существенным вкладом в исследования, касающиеся регуляции метаболизма прокариот и роли малатдегидрогеназной ферментной системы в адаптации бактериальных организмов к неблагоприятным факторам среды, что способствует созданию целостной картины и современных представлений о механизмах трансформации метаболических потоков в клетках живых существ. Получение препаратов МДГ в электрофоретически гомогенном состоянии открывает перспективы для их использования в научно-исследовательской практике, анализе структурной организации белковых молекул, лабораторных работах, биореакторах и в медицинской биотехнологии.

Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего МДГ из *Rh. steppense*, в качестве электрофоретического маркера может найти широкое применение в популяционной генетике и эволюционной экологии, использоваться в филогенетическом анализе, анализе генетического разнообразия, индивидуального развития, а также для определения между- и внутривидовой дивергенции у прокариотических организмов.

Кроме того, МДГ служит высокоэффективным усилителем растворимости в бактериальной цитоплазме при использовании в качестве фьюжн-партнера при экспрессии подверженных агрегации гетерологичных белков в бактериальных экспрессирующих системах (*E. coli*), что в настоящее время имеет важнейшее значение для биотехнологии и коммерческих отраслей. Денатурированная малатдегидрогеназа подходит для использования в качестве субстрата в экспериментах по выявлению и изучению новых функций шаперонов.

Прикладные аспекты исследования галоалкалофильных несерных пурпурных бактерий *Rh. steppense* связаны с возможностью их применения в биотехнологических целях, для очистки сточных вод, удаления токсичных веществ, процессов минерализации.

Научные положения диссертации включены в учебный процесс на медико-биологическом факультете Воронежского государственного университета, в том числе в материалы лекций и спецкурсов, используются при проведении практикумов, подготовке к курсовым и дипломным работам.

Положения, выносимые на защиту.

1. Изменение типа культивирования бактерий *Rh. steppense* при переходе с фототрофного анаэробного роста (МДГ представлена одной изоформой) на хемотрофный в присутствии кислорода приводит к переключению метаболических потоков и индукции в стрессовых условиях трех молекулярных форм малатдегидрогеназной ферментной системы, что можно считать механизмом адаптивной реакции клеточного метаболизма исследуемых микроорганизмов.
2. Выделенные гомогенные препараты МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 демонстрируют отличия кинетических и регуляторных характеристик, обусловленные их специфическим участием в процессах адаптивной реакции *Rh. steppense*. С помощью денатурирующего электрофореза и метода масс-спектрометрического пептидного фингерпринт-анализа показано, что данные изоферменты являются олигомерами, сформированными из гомологичных субъединиц с $M_r = 35.06$ кДа.
3. Димерная, тетрамерная и октамерная формы фермента кодируются единственным геном *mdh* в геномной ДНК *Rh. steppense* и являются изоформами, образующимися в результате посттрансляционной модификации путем олигомеризации одинаковых субъединиц.
4. Многократное увеличение экспрессии *mdh* при хемотрофном аэробном типе культивирования исследуемых микроорганизмов по сравнению с уровнем экспрессии из бактерий, выращенных анаэробно на свету и

характеризующихся единственной формой энзима, а также четкая корреляция с изменением каталитической активности МДГ свидетельствуют о повышении в условиях стресса концентрации мРНК гена *mdh* и синтезе дополнительных изоформ фермента.

5. Установлена функциональная роль олигомерных изоформ МДГ при смене типа питания и условий культивирования *Rh. steppense*: МДГ 1 играет определенную роль в адаптации галоалкалофильных бактерий к существованию в условиях оксидативного стресса и участвует в процессах синтеза осмолитов, азотном обмене, глюконеогенезе; МДГ 2 обеспечивает функционирование ЦТК, а МДГ 3 – глиоксилатного цикла с выходом на конструктивный метаболизм.

Апробация работы. Доклады по материалам диссертационной работы были представлены на университетских, региональных и международных конференциях. Их обсуждение проводилось на 18-ой и 19-ой международных конференциях молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2015, 2016); Всероссийской научной конференции 8-го съезда физиологов России (Петрозаводск, 2015); посвященных памяти проф. Землянухина А. А. межрегиональных конференциях «Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов» (Воронеж, 2015–2017); отчетных конференциях научной сессии ВГУ «Эколого-физиологические и физико-химические основы взаимодействия биосистем различных уровней организации с окружающей средой» (Воронеж, 2015, 2016).

Публикации. Результаты данной диссертационной работы представлены в 12 публикациях: четыре – в печатных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, три из них – индексируемых Web of Science.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 145 страницах и включает: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы (223 источника). Иллюстрационный материал представлен в виде 5 таблиц и 62 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Физиолого-биохимические особенности метаболизма фототрофных пурпурных бактерий

Около 97% всей воды на Земле присутствует в океанах, соленых озерах, внутренних морях, минерализованных грунтовых водах, и примерно одна четверть всей поверхности на Земле подстилается отложениями солей [140, 214]. Таким образом, минерализованные и гиперсоленые среды являются весьма распространенными и имеют важное экологическое значение [20]. Кроме того, соленость является основным фактором, определяющим состав микробных сообществ [114]. Поэтому адаптации галофильных видов микроорганизмов, метаболизм которых отличается рядом специфических особенностей, представляют всеобщий биологический интерес. Высказана гипотеза, что микробные сообщества, населяющие содовые озера, могут рассматриваться как реликтовый аналог наземной биоты раннего протерозоя [13, 133].

Своеобразие автохтонной микрофлоры таких водоемов, их особую специфику как среды обитания подчеркивает изобилие выделяемых форм бактериальных организмов всех физиологических групп. Описано много новых таксонов галоалкалифильных, аноксигенных, фототрофных, главным образом, пурпурных бактерий [13, 133].

Сообщества аноксигенных фототрофных бактерий данных мест обитания (не менее 15 видов) отличаются большим разнообразием и постоянством видового состава: преобладают пурпурные серобактерии семейств *Ectothiorhodospiraceae* и *Chromatiaceae*, а также фиолетовые несерные пурпурные бактерии семейства *Rhodobacteraceae*, обнаружены зеленые нитчатые бактерии *Oscillochloris sp.* и гелеобактерии (рис. 1) [110].

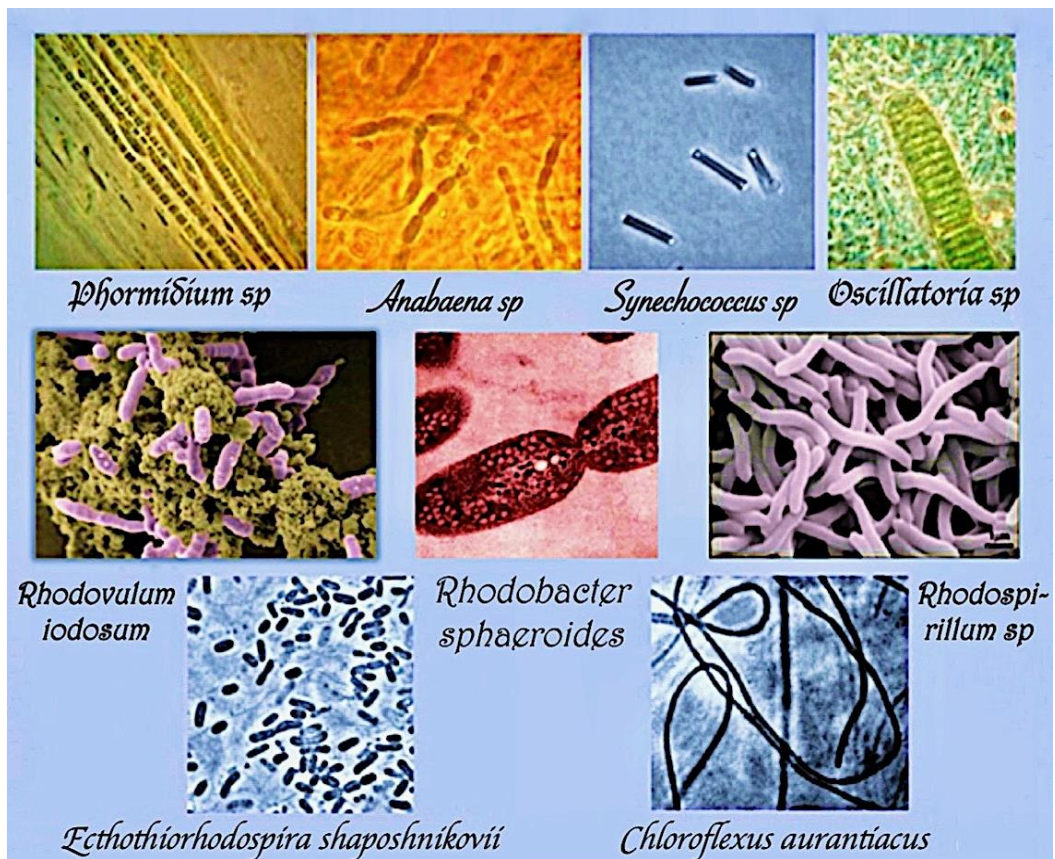


Рис. 1. Микробные сообщества соленых озер.

1.1.1. Галоалкалофильные прокариоты *Rhodovulum steppense* A-20s^T и их характеристика

Несерные пурпурные бактерии характеризуются высокой степенью адаптации к нестабильным условиям среды. При исследовании мелководных степных содовых озер в криоаридной зоне Средней Азии было выявлено широкое распространение галоалкалофильных НПБ, принадлежащих к семейству *Rhodobacteraceae* [165].

В соответствии с результатами секвенирования гена 16S рНК, семь выделенных изолятов образуют кластер в пределах рода *Rhodovulum*, демонстрируя 99.5% идентичности последовательности 16S рНК с *Rhodovulum strictum*, 96.4% – с *Rhodovulum euryhalinum* и *Rhodovulum sulfidophilum* и 94-95% – с другими видами рода *Rhodovulum*. Идентичность последовательности с видами рода *Rhodobacter* составила 92–94%. Кроме

того, результаты ДНК-ДНК-гибридизации позволили подтвердить, что данные изоляты принадлежат одному виду (93–98% уровня гибридации) и были классифицированы как новый вид рода *Rhodovulum* – *Rhodovulum steppense* sp. nov., типовой штамм А-20s^T (5VKM В-2489Т 5DSM 21153Т) (рис. 2).

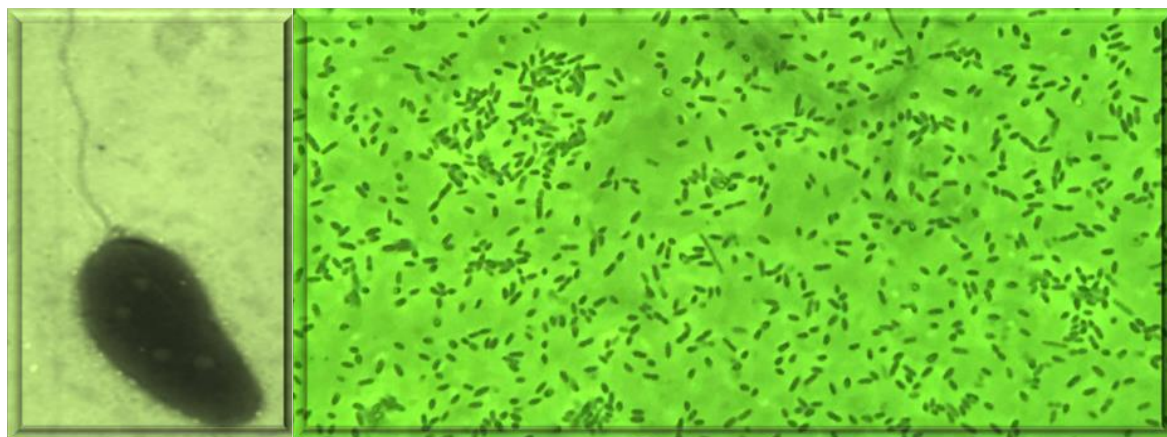


Рис. 2. Микрофотография клеток *Rhodovulum steppense* штамм А-20s^T.

Исследуемый штамм А-20s^T был выделен в Агинско-Бурятском автономном округе из о. Хилганта, отличающимся от большинства содовых озер этого региона повышенным значением щелочности, рН (глубина 35-45 см, минерализация – 45 г/л, щелочность – 30 мг·эquiv/л, рН 9.5) и заметно выраженным развитием микробных матов (рис. 3).

Все штаммы *Rh. steppense* характеризуются рядом общих морфологических свойств. В естественных образцах и во время изоляции культуры клетки имели форму тонких удлинённых палочек (шириной 0.3–0.5 мкм и длиной 1.2–2.5 мкм), которые стали короче и толще после серии пассажей (0.4–0.8 мкм шириной и 1–2 мкм в длину). Клеточная морфология может варьировать при изменении значений величин рН, концентрации NaCl, в зависимости от используемого субстрата и степени анаэробноза. Клетки исследуемых бактерий подвижны, их внутренние фотосинтезирующие

мембраны образуют множественные везикулы. Ультратонкие срезы клеток штамма А-20s показали грамотрицательный тип клеточной стенки [110].



Рис. 3. Щелочное соленое озеро Хилганга.

При анаэробном типе культивирования исследуемые микроорганизмы демонстрируют окраску колоний от желтого и зеленого до коричневого цветов; в присутствии кислорода культуры клеток краснеют. Фотосинтетические пигменты представлены бактериохлорофиллом а и каротиноидами ряда сфероиденов.

Изоляты *Rh. steppense* штамм А-20s способны расти анаэробно в присутствии света (фотогетеротрофно) или аэробно в темноте (хемотротрофно). При культивировании бактерий использовали широкий спектр органических соединений. Установлено, что наиболее быстрый рост детектируется на средах, в состав которых входят жирные кислоты (пропионат, бутират), в отличие от *Rh. strictum*, который предпочитает кислоты ЦТК. Аланин, аргинин, аспартат, орнитин, пролин, треонин, валин, цитрат, бензоат, тартрат, арабиноза, глюкоза, мальтоза и фруктоза поддерживают медленный рост. Анаэробного дыхания на нитритах, нитратах или фумарате в качестве терминального акцептора электронов, а также

ферментации с пируватом, глюкозой или фруктозой продемонстрировано не было. Однако исследуемые микроорганизмы способны к фотолитоавтотрофному росту, окисляя серу, тиосульфат и сульфиды до сульфатов. При окислении сульфида как донора электронов наблюдается отложение внеклеточной элементарной серы [110].

Для *Rh. steppense* не было зафиксировано роста (что показано для *Rh. strictum*) при культивировании на средах, содержащих водород. Но все штаммы А-20s и *Rh. strictum* JCM 9220^T смогли расти хемолитоавтотрофно с сульфидом и тиосульфатом.

В качестве факторов роста, необходимых рассматриваемым микроорганизмам, выступают три витамина (биотин, тиамин, ниацин) или дрожжевой экстракт (0.05-0.1 г·л⁻¹) [165].

Анаэробно на свету и в присутствии органических соединений бактерии *Rh. steppense* штамм А-20s^T восстанавливают селенит и теллурит (при начальных концентрациях до 10 мМ) до элементарного селена и теллура. Устойчивы к амикацину, ампициллину, хлортетрациклину, бацитрацину, ванкомицину, гентамицину, нистатину, налидиксовой кислоте, новобиоцину, пенициллину, рифампицину, канамицину, линкомицину, неомицину и стрептомицину; чувствительны к тетрациклину, бензилпенициллину и полимиксину В [110].

1.1.2. Метаболизм пурпурных бактерий

У пурпурных бактерий хорошо работают цикл Кребса, гликолиз и другие катаболические пути [165].

ЦТК является одним из наиболее важных центральных метаболических путей в живых клетках [187]. Давно известно, что этот цикл часто выполняет двойную функцию: принимает участие в энергетических процессах и биосинтезе ключевых клеточных интермедиатов для анаболических реакций. Например, 2-оксоглутарат и оксалоацетат могут служить для биосинтеза

аминокислот, сукцинил-кофермент – для синтеза гема у некоторых бактерий. Последняя функция особенно важна в анаэробных условиях, когда обычный полный «аэробный» ЦТК преобразуется в две ветви: окислительную, или C₆-ветвь, – от цитрата до 2-оксоглутарата и восстановительную, или C₄-ветвь, – от оксалоацетата до сукцината. В основном это происходит в результате анаэробной репрессии мультиферментного комплекса 2-оксоглутаратдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы и индукции фумаратредуктазы. Механизмы регуляции такого явления у бактерий хорошо известны. У *Escherichia coli*, например, они включают в себя кислород-чувствительные активности белков Fnr и ArcA/ArcB системы [88, 223]. Однако метаболизм не всех прокариот соответствуют описанной модели. С появлением методов геномного секвенирования стало очевидным, что существует множество вариаций «классического» ЦТК, и большое количество бактерий, в частности, патогенных микроорганизмов, оказывается, обладают неполным или необычным вариантом ЦТК, отклоняющимся от парадигмы, установленной для *E. coli*. Действительно, на основе анализа 19 полностью секвенированных бактериальных геномов, Ниунен пришел к выводу, что у большинства видов цикл неполный или даже отсутствует, что отражает особые метаболические адаптации к образу жизни конкретного организма. Кроме того, фактические биохимические эксперименты могут выявлять активности, для которых не существует никакого гена. Но при более тщательном поиске идентичности нуклеотидных последовательностей можно «найти» ген или негомологичное перемещение генов «неожиданных» ферментов, выполняющих данную функцию [88].

Поступление многих субстратов в центральный метаболизм углерода происходит на уровне ацетил-кофермента А. Эти субстраты включают: ацетат, жирные кислоты, спирты, алканы, и т.д. У аэробных и факультативно-анаэробных бактерий усвоение ацетил-КоА в цикле лимонной кислоты отличается при обходе двух декарбоксилирующих шагов: изоцитрат расщепляется на сукцинат и глиоксилат, последний

конденсируется со второй молекулой ацетил-КоА с образованием малата, приводя в итоге к чистой фиксации двух молекул ацетил-КоА в одной молекуле малата [88].

За последние пять десятилетий было показано, что некоторые микроорганизмы не используют глиоксилатный цикл для ассимиляции ацетил-КоА [137]. У соответствующих представителей НПБ не обнаружено активности изоцитратлиазы, а секвенирование геномов показало отсутствие соответствующего гена. Примерами являются: *Methylobacterium extorquens*, *Rhodobacter sphaeroides* и *Rhodospirillum rubrum*. Другие организмы, по-видимому, содержат ген изоцитратлиазы, но она не экспрессируется при определенных условиях роста, даже при выращивании на ацетате. Примерами могут служить *Rhodobacter capsulatus* и *Streptomyces collinus* [10, 30, 122, 189, 207].

Существуют два основных варианта альтернативного пути ассимиляции ацетил-КоА [30, 125, 203]. А наиболее изучены бактерии вида *Methylobacterium extorquens* [125]. Первоначальной реакцией предлагаемого пути является конденсация двух молекул ацетил-КоА в ацетоацетил-СоА, который превращается в бутирил-КоА. Карбоксилирование бутирил-КоА приводит к образованию метилсукцинил-КоА через этилмалонил-КоА. Сложная последовательность реакций, включающая в себя декарбоксилирование и перегруппировку углеродного скелета, приводит к формированию пропионил-КоА. Малат формируется в ходе обычных реакций. Происходит карбоксилирование пропионил-СоА в метилмалонил-КоА и преобразование метилмалонил-КоА через сукцинил-КоА в малат. Рассматриваемый путь требует наличия кротонил-КоА редуктазы, а также кофермент-В12-зависимой мутазы, катализирующей реакцию перегруппировки «углерод-углерод». Подобные гены были обнаружены и имеют важное значение для роста на ацетате у *Streptomyces collinus* [207].

Исследования меченных изотопами ацетата и бикарбоната в клеточных компонентах культур или суспензий *Rh. rubrum* и соответствующих

ферментов, также дали возможность установить существование альтернативного пути ассимиляции ацетата [30, 137, 203]. Список бактерий, не имеющих изоцитратлиазы, распространился на *Rh. sphaeroides*, *Rh. capsulatus*, *Blastochloris viridis* and *Phaeosporillum fulvum* [69, 122, 189].

Было высказано предположение, что фототрофы *Rh. rubrum* и *Rh. sphaeroides* используют так называемый цитрамалатный цикл для ассимиляции ацетата [30, 69, 203]. Этот гипотетический путь состоит из трех этапов. На первом пируват и ацетил-КоА преобразуются с помощью цитрамалата в пропионил-КоА и глиоксилат. На втором этапе пропионил-КоА карбоксилируется и преобразуется в сукцинат. На третьем – глиоксилат конденсируется с другой молекулой ацетил-КоА в малат, из которого реформируется исходная молекула пирувата.

У бактерий *Rh. sphaeroides*, культивируемых на ацетате, предполагается наличие альтернативного глиоксилатного цикла. При его исследовании у *Rh. sphaeroides* использовали несколько подходов: транспозонный мутагенез, анализ протеома и детекцию активности ферментов. Рассматриваемый путь состоит из двух частей. Во время первой две молекулы ацетил-КоА преобразуются в C4-соединения. Данный C4-продукт карбоксилируется с образованием C5-промежуточного продукта и превращается в β-метилмалил-КоА, который расщепляется на глиоксилат и пропионил-КоА. Вторая часть состоит из карбоксилирования пропионил-КоА, его преобразования в сукцинат при помощи обычных реакций и ассимиляции глиоксилата путем конденсации с молекулой ацетил-КоА с образованием малата через малил-КоА [189].

У бактерий *Rhodococcus opacus* штамм PD630 ГЦ активируется при выращивании культуры на ацетате. Использование ферментов изоцитратлиазы и малатсинтазы исключает потери углерода в виде CO₂ и пополняет ЦТК промежуточными метаболитами [162].

Ацетатный метаболизм способствует деактивации фермента изоцитратдегидрогеназы и тем самым увеличивает содержание изоцитрата, направляя его через глиоксилатный цикл, как показано для *E.coli* [221].

У некоторых бактерий происходит прямое преобразование глиоксилата в глицин в присутствии внеклеточного глиоксилата. Уникальный фермент – глициндегидрогеназа – был обнаружен у видов *Mycobacterium* и участвует в поддержании окислительно-восстановительного баланса, а также внутриклеточной детоксикации жирных кислот и побочных продуктов [33, 171].

С использованием геномной базы данных KEGG продемонстрировано наличие двух генов, аннотированных как глициндегидрогеназы: *LPD04987* и *LPD07163*. Метод ОТ-ПЦР позволил подтвердить присутствие генов глициндегидрогеназы у бактерий *Rh. opacus* [162].

Таким образом, фототрофные пурпурные несерные бактерии, способные расти на ацетате, по наличию ключевых ферментов глиоксилатного цикла условно можно разделить на три группы: первая включает виды, у которых не обнаружена активность изоцитратлиазы и ацетат метаболизируется через цитрамалатный цикл (*Rh. rubrum*, *Rh. sphaeroides*); вторая группа объединяет виды, у которых нет малатсинтазы (*Rubrivivax gelatinosus*, *Rhodopseudomonas gelatinosa*); третья группа – виды, имеющие оба фермента, например *Rh. palustris*, у которого функционирует не только ЦТК, но и глиоксилатный цикл [1].

1.2. Характеристика малатдегидрогеназной ферментной системы

1.2.1. Метаболические пути, в которых участвует малатдегидрогеназа

Малатдегидрогеназа (МДГ) на сегодняшний день оценивается как одна из самых полезных оксидоредуктаз (конъюгат для иммуноферментного

анализа) с возможностями применения в диагностических, терапевтических, биотехнологических целях и в пищевой промышленности [22, 132, 174].

Малатдегидрогеназа является одним из промежуточных ферментов ряда метаболических путей, включая цикл Кребса, и катализирует обратимое превращение оксалоацетата и малата в присутствии НАД(Ф)⁺ [146]. Помимо ЦТК, важнейшее значение МДГ на сегодняшний день показано для таких обменных процессов, как аминокислотный синтез (аспартата и аспарагина), глюконеогенез, сопровождение и поддержание необходимого окислительно-восстановительного баланса, для метаболитного обмена между цитоплазмой и субклеточными органеллами, а также и для процессов метаболического стресса. После окисления малата до оксалоацетата, последний может служить в качестве субстрата для восполнения ЦТК (цитратсинтаза). Исследуемый фермент, как и ФЕП-карбоксикиназа, необходим для использования малата в качестве источника углерода. Кроме того, МДГ функционирует в малат-аспартатном трансфере (малат-аспартатный челнок). Например, митохондриальная и цитозольная МДГ обеспечивают правильный баланс соотношения НАД⁺/НАДН между митохондриальным и цитозольным пулом [25, 59, 91, 126, 204].

У большинства бактерий, архей и эукариот ЦТК принимает участие в производстве энергии и предшественников для анаболического пути. В этом каскаде из восьми реакций ацетильная группа ацетил-КоА окисляется до CO₂ и электроны переносятся на хинон, НАД⁺, а у многих микроорганизмов и на НАДФ⁺ посредством НАДФ⁺-зависимой изоцитратдегидрогеназы. НАДН окисляется в дыхательной цепи для увеличения протонной движущей силы, НАДФН служит в качестве донора электронов в анаболизме [48].

Молекулы-предшественники для анаболизма, поставка которых обеспечивается функционированием ЦТК, такие как 2-оксоглутарат, используются для синтеза глутамата или оксалоацетата, и далее могут быть преобразованы в аминокислоты семейства аспартата. Например, оксалоацетат (ОА) является предшественником для биосинтеза аспартата,

аспарагина, лизина, метионина и треонина [32, 83]. Данная сложная цепь реакций представляет собой лишь один из вариантов протекания различных обменных процессов с участием ферментов малатдегидрогеназной системы в центральном метаболизме углерода, азота или в анаболизме нуклеотидов.

Малатдегидрогеназа и фосфоенолпируваткарбоксикиназа необходимы для дальнейшей утилизации малата уже в процессе глюконеогенеза [126].

Большое количество сложных реакций клеточного метаболизма предполагает организацию ассоциированных ферментов в мультиферментные комплексы, которые называются метаболонами. Образование метаболона способно упорядочить обменные процессы, направляя промежуточные продукты по определенным путям их превращений, чтобы наилучшим образом использовать метаболические потоки в клетке. Такое явление было названо «ченнелинг субстрата» [197].

Недавние исследования *Bacillus subtilis in vivo* показали, что специфические ферменты цикла трикарбоновых кислот могут образовывать комплексы, которые обеспечивают эффективный трансфер метаболитов. Примечательно, что был выявлен комплекс малатдегидрогеназы с изоцитратдегидрогеназой, хотя оба фермента не катализируют последующие реакции. Проведенные анализы позволили выявить слабое, но специфическое взаимодействие между МДГ и ИДГ, которое стимулировалось смесью субстратов и кофакторов ИДГ: изоцитратом, НАДФ⁺ и Mg²⁺. Эти данные демонстрируют субстратный контроль комплексообразования при сборке метаболона ЦТК и поддержания уровня 2-оксоглутарата для анаболизма аминокислот *in vivo* [48].

Малатдегидрогеназа является высокоэффективным и сильным растворителем для склонных к агрегации гетерологичных белков при использовании в качестве экспрессирующего фьюжн-партнера в системе экспрессии *E. coli* и может оказаться полезной при производстве биологически активных промышленных ферментов, включая микробные

кутиназы, которые представляют большой интерес для биотехнологии и коммерческих отраслей [61].

1.2.2. Структурная организация малатдегидрогеназы

МДГ во всех эукариотических клетках присутствует как в виде митохондриальных, так и цитоплазматических изоэнзимов, тогда как у прокариот выявлена только одна форма фермента [22].

Белки, которые связывают динуклеотиды, занимают центральное место в обмене веществ при производстве энергии и использовании ресурсов. Выравненные многочисленные аминокислотные последовательности малатдегидрогеназы проявляют низкую степень структурной гомологии, за исключением нескольких положений, имеющих важное значение для процессов связывания нуклеотидов, катализа и интерфейса субъединиц. Полипептидные цепи составляют от 300 до 340 аминокислот [150].

Все ферменты МДГ демонстрируют наличие каталитического С-терминального и НАД-связывающего домена, который присутствует в N-концевой части каждой молекулы и содержит так называемый мотив укладки Россмана со сходной структурой β -листа. Данная классическая структурная последовательность связывания с динуклеотидом, или мотив Россмана, представляет собой чередующиеся β -структуры и α -спиральные участки в соответствии с моделью « $\beta\alpha\beta\beta$ », характерной для всех НАД-связывающих белков. Две α -спирали укладываются с одной стороны трехслойного параллельного β -листа (рис. 4).

НАД-связывающие домены обычно содержат дополнительный, связанный с первым, мотив Россмана. В итоге формируется шестицепочечная расширенная бета-структура типа « $\beta\alpha\beta\beta\cdot\beta\alpha\beta\beta$ ».

Несмотря на различия в общей топологии кофактор-связывающих доменов МДГ различного происхождения, все они содержат, по меньшей

мере, область «ядерной» топологии (динуклеотид-связывающее ядро) – минимальную структуру, необходимую для связывания кофактора. Первые 30–35 аминокислот такой « $\beta\alpha\beta\beta$ »-структуры, называемые областью «отпечатков пальцев», являются диагностическими для данного участка. Существуют четыре основные характеристики этого «фингерпринт»-региона: 1) фосфат-связывающая последовательность, 2) шесть положений, обычно занимаемых небольшими гидрофобными аминокислотами, 3) консервативный, отрицательно заряженный остаток (Glu или Asp) в конце второй β -цепи данной области и 4) консервативный положительно заряженный остаток (Arg или Lys) в начале первой β -цепи [22].

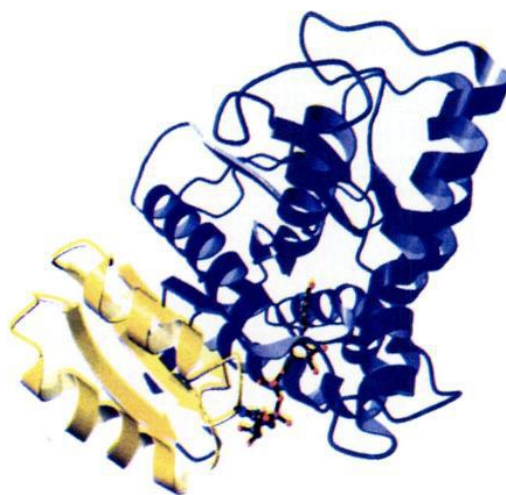


Рис. 4. Структура НАД-связывающего домена МДГ. « $\beta\alpha\beta\beta$ »-элемент укладки Россмана выделен желтым цветом, модель «шарик-палочка» изображает кофактор НАД⁺ (Bellamacina, 2016).

Кофактор принимает вытянутую конформацию и расположен примерно перпендикулярно динуклеотид-связывающему ядру β -слоев на С-терминальном конце параллельного β -листа. Пирофосфатная группа лежит над первой α -спиралью, аденин которой направлен вдоль неглубокой бороздки поперек верхней части изгиба между первым β -слоем и первой α -спиралью, тогда как никотинамид расположен в глубокой щели,

направленной вниз между четвертым β -слоем и уложенными на β -лист аминокислотными остатками (рис. 5).

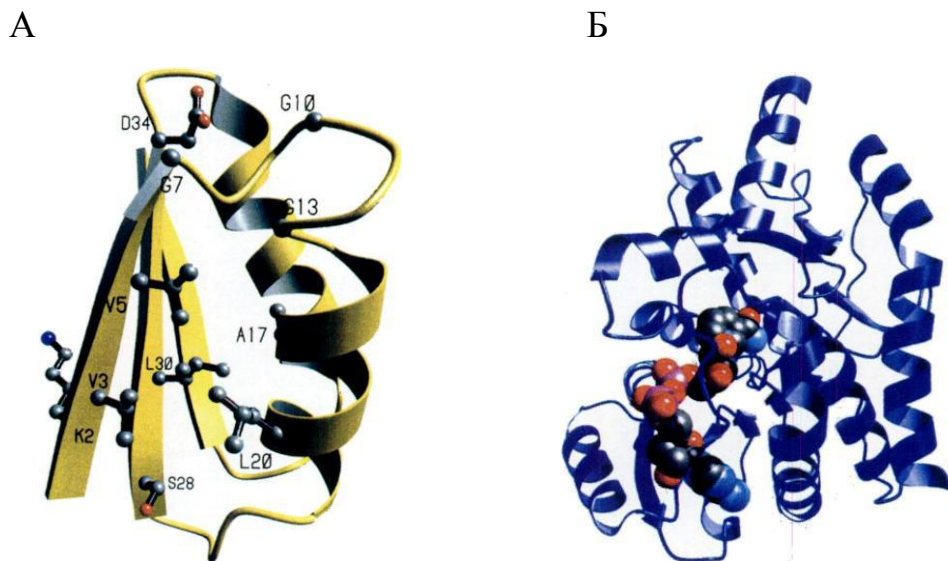


Рис. 5. (А): « $\beta\alpha\beta\beta$ »-элемент укладки Россмана (АК от 1 до 59): консервативные или важные остатки «фингерпринт»-области изображены в виде модели «шарик-палочка»; (В): пространственная модель домена МДГ, показывающая ориентацию кофактора: углерод выделен черным; кислород - красным; азот - синим; фосфат – розовым (Bellamacina, 2016).

N-концевой и каталитический С-домен удерживаются вместе с помощью множества водородных связей и гидрофобных взаимодействий (рис. 6).

Сравнение различных прокариотических и эукариотических ферментов малатдегидрогеназной системы показало преимущественно гомодимерную организацию и высокое структурное сходство 3D-структурных моделей, несмотря на низкий процент идентичности последовательностей аминокислот первичных структур [48]. Мультимерные МДГ, состоящие из одинаковых субъединиц с молекулярными массами от 30 до 35 кДа, а иногда и до 90 кДа, как правило, организованы либо как димеры, либо как тетрамеры (рис. 7).

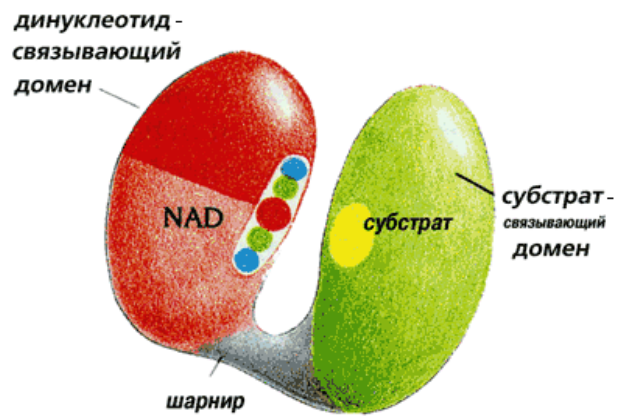


Рис. 6. С-терминальный и НАД-связывающий домены молекулы МДГ.

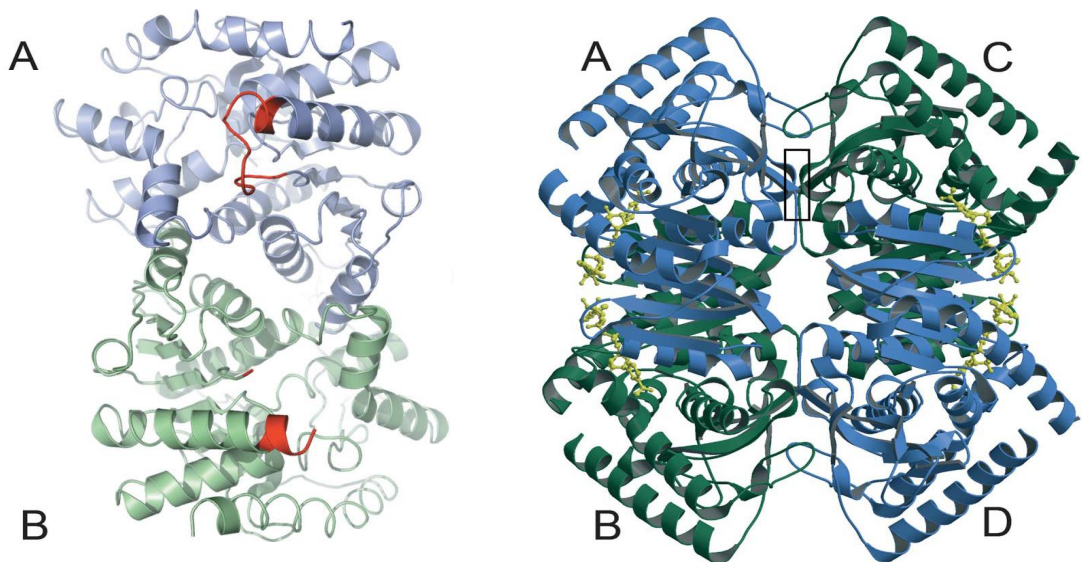


Рис. 7. Структура гомодимерной и гомотетрамерной молекулы МДГ: А, В, С, D – идентичные субъединицы (Zaitseva, 2009; Vjorn, 2004).

Каждая субъединица функционирует независимо в плане катализа, признаков кооперации между каталитическими центрами не выявлено. При образовании тройного комплекса фермент-кофермент-субстрат внешняя петля активного центра закрывается, действуя как скрининговая заслонка каталитической вакуоли. Между аминокислотной последовательностью петли и внутренней частью каталитического «кармана» формируется сеть ионных взаимодействий. Остатки Arg 81, Lys 82 и Arg 87 могут образовывать

несколько ионных пар с аминокислотными остатками, расположенными внутри участка катализа (рис. 8).

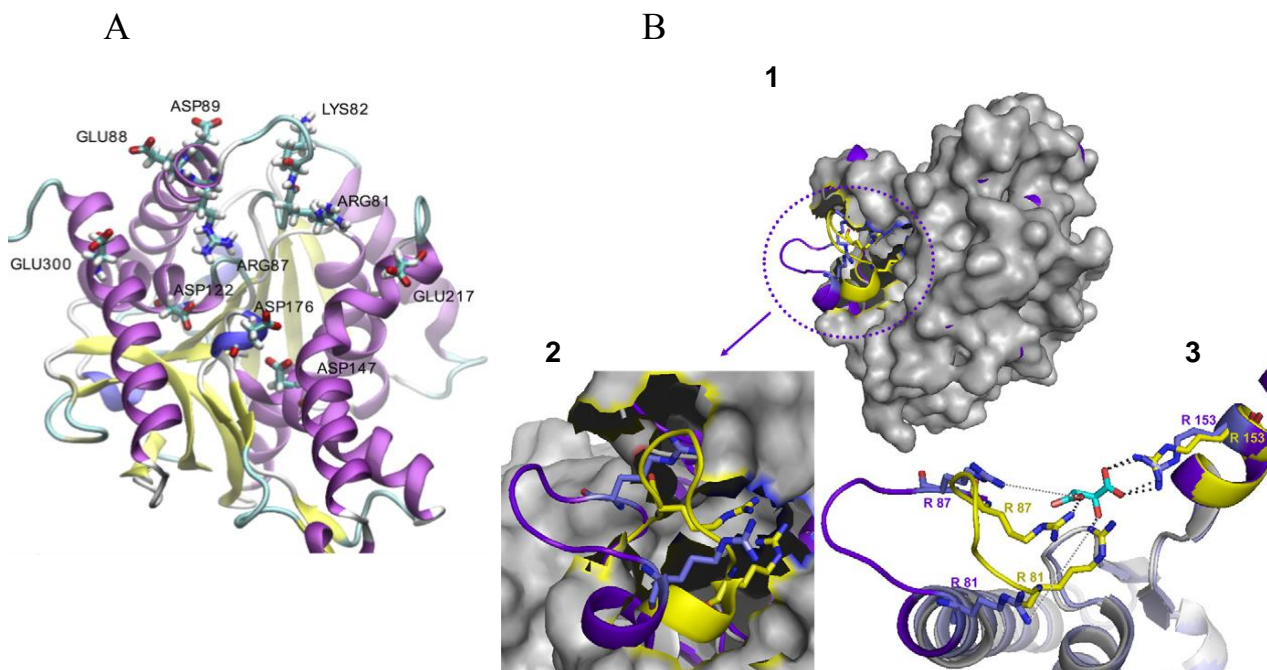


Рис. 8. (А): солевые мостики внешней петли каталитического центра молекулы МДГ и ионные пары, образующиеся в течении 200 нс: Arg81-Glu217, Arg81-Asp147 и Arg81-Asp176, Lys82-Asp89 и Arg87-Asp176, Arg87-Asp122, Arg87-Glu300 и Arg87-Glu88 (Kalimeri, 2014). (В): модель активного центра МДГ из *Aeromonas hydrophila* (1); петля активного сайта в двух конформациях – открытой (фиолетовый цвет) и закрытой (обозначена желтым) (2); расстояние от трех остатков аргинина (R 81, R 87 и R 153) до субстрата (малат) с учетом двух конформаций (3, Farfan, 2010).

Повышенная гибкость петли коррелирует с переменной динамикой образования остатком Arg 87 ионных пар с Asp 122 или Asp 176 и Glu 300. На самом деле, это основная аминокислота связывает одну из карбоксильных групп субстрата. Поэтому во время процесса формирования связей ионные пары, образованные остатком Arg 81, должны быть заменены функциональными взаимодействиями с субстратом [97].

1.2.3. Типы пространственной организации малатдегидрогеназы

Ферменты малатдегидрогеназной системы всех трех доменов жизни (бактерии, эукариоты и археи) были достаточно широко изучены и сгруппированы как димерные, тетрамерные и ЛДГ-подобные [146]. МДГ некоторых эубактерий (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*) проявляет высокую идентичность аминокислотной последовательности с митохондриальной изоформой эукариот, в то время как другие (*Thermus spp.*) – более тесно связаны с цитоплазматическими и хлоропластными эукариотическими изоэнзимами. Очень интересны и ферменты архей, показывающие высокое структурное сходство последовательностей с лактатдегидрогеназой (*Haloarcula markmortui*) [22].

Тем не менее, кинетические и биохимические свойства бактериальных МДГ не столь хорошо изучены в отличие от энзимов из животных и растений, как и кристаллические структуры, не так давно доступные только для ферментов *E. coli*, *T. flavus* и *Aquaspirillum arcticum* [66, 221].

Были проанализированы трехмерные модели димерных и тетрамерных форм МДГ [46, 66, 112, 196]. Димерные ферменты имеют гомологичные активные центры, кофактор-связывающие сайты и четвертичные структуры, хотя некоторые белки демонстрируют очень низкую степень идентичности аминокислотной последовательности (<20%) [51]. Интересно отметить, что тетрамерные МДГ, по данным кристаллографического анализа, характеризуются структурным сходством с семейством лактатдегидрогеназ [85, 112, 218, 221]. Поэтому предполагается, что ЛДГ не являются результатом первичной наследственной дупликации от димерных МДГ, а, весьма вероятно, произошли от тетрамерных посредством очень недавней генетической дупликации. Эта гипотеза подтверждается превращениями МДГ *E. coli* в активную ЛДГ и ЛДГ *Bacillus stearothermophilus* в высокоспецифичную МДГ [63, 66, 218].

Показано, что белки тетрамеров из термофильных бактерий проявляют большую механическую жесткость по сравнению с гомологичными ферментами МДГ из мезофильных микроорганизмов. Данное явление считается результатом более эффективных взаимодействий между доменами: изолированный домен термофильного энзима более гибкий, чем соответствующий мезофильный. После олигомеризации белка индуцированная жесткость оказывает непосредственное влияние на механизм связывания кофактора и субстрата и распространяется от поверхности к активному центру, в котором петля, контролирующая доступ к каталитическому участку, прикрепляется посредством расширенной сети ионных пар. В тетрамерных формах энзима из мезофильных видов, напротив, петли являются очень мобильными [7, 97, 183].

Характеристики различных взаимодействий на границе «мономер-мономер» и широкое распространение гомологичных димеров мезофильных МДГ позволяют описывать тетрамерную форму как «димер димеров» (рис. 9).

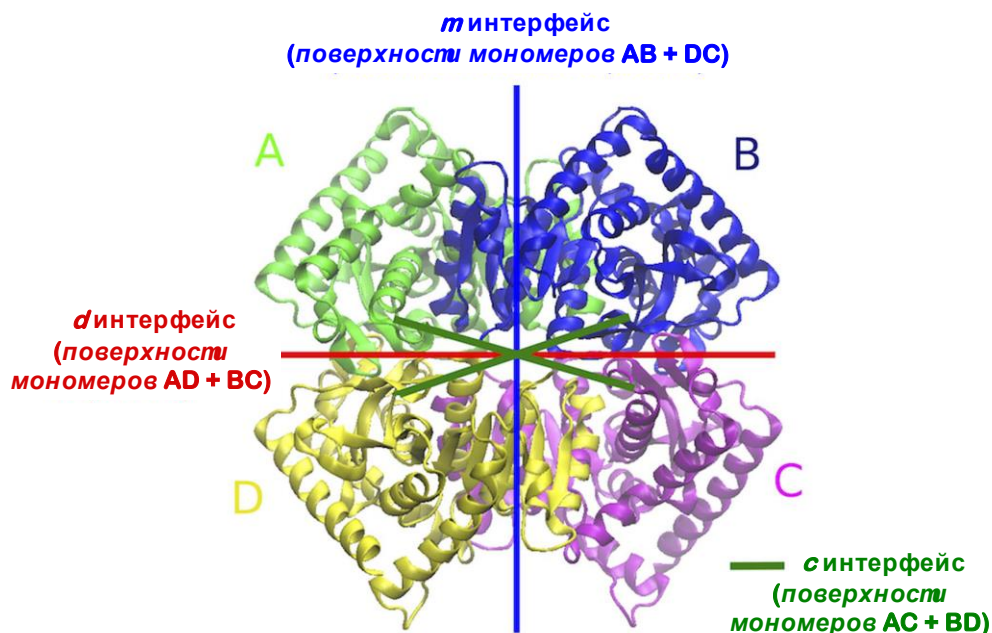


Рис. 9. Структурная модель тетрамерной МДГ (Kalimeri, 2014).

Субъединицы A+B и C+D образуют каждый из двух димеров, которые,

в свою очередь взаимодействуют друг с другом, формируя тетрамер [97, 182].

В настоящее время были изучены и описаны некоторые ЛДГ-подобные архейные МДГ, которые включают энзимы из *Sulfolobus acidocaldarius*, *Thermoplasma acidophilum*, *Haloarcula marismortui*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Pyrobaculum islandicum* и *Aeropyrum pernix* [57, 96, 85, 117, 146, 163, 185, 202, 216].

Недавние исследования указывают на наличие нового семейства МДГ, признанного отличным от белков с традиционной структурой укладки Россмана. Энзимы образованы двумя или четырьмя одинаковыми субъединицами по 30-37 кДа, в результате чего мультимерные ферменты организованы как димеры и тетрамеры [18, 22].

В 1990 году Хонка и др. обнаружили фермент, проявляющий малатдегидрогеназную активность у чрезвычайно термофильного метаногена *Methanothermus fervidus* [18]. Гомодимерная форма с молекулярной массой субъединиц 37 кДа проявляет низкую специфичность к НАД⁺ или НАДФ⁺ и катализирует преимущественно восстановление оксалоацетата. Интересно, что аминокислотная последовательность этого архейного энзима демонстрирует поразительно низкое сходство с уже известными МДГ и ЛДГ эубактерий и эукариот. Это открытие привело к предположению, что ферменты термофильных метаногенов эволюционно отличаются от ортодоксальных. Следовательно, МДГ из *M. fervidus*, ЛДГ из граммотрицательной бактерии *Alcaligenes eutrophus*, а также их гомологи представляют собой отдельную, филогенетически отличную от традиционных белков ветвь МДГ/ЛДГ и были аннотированы как малат-лактат-дегидрогеназы типа-2 или новый тип архейной малат/L-лактат-дегидрогеназы. В настоящее время обнаружено, что данное семейство белков содержит восемь групп функционально более разнообразных ферментов [18, 80, 136, 217].

Структурные последовательности этого семейства НАД(Ф)-зависимых оксидоредуктаз идентичны друг другу и не имеют мотива «GXGXX» (G/A), характерного для укладки Россмана (является типичной для сайта связывания никотинамидных нуклеотидов), представляющей собой ядро из шести параллельных слоев β -листа, окруженных с двух сторон α -спиралями. Каждый мономер структуры рассматриваемого семейства содержит 11 β -цепей и 12 α -спиралей. Взаимодействующие поверхности на границе «мономер-мономер» являются, по существу, гидрофобными; ферменты имеют новый скелет полипептидной основы и новый способ распознавания кофакторов НАД(Ф). Пирофосфатная группа НАД(Ф) взаимодействует с β -листом, а также с ϵ -аминогруппой остатка Lys 237 другого мономера (рис. 10). Стабилизация путем взаимодействия с диполем спирали, детектируемая у ферментов типа Россмана, не наблюдается. Отрицательно заряженный Glu 305 сохраняется у НАД-зависимых энзимов и взаимодействует с 2'-гидроксильной группой НАД⁺ [18, 23].

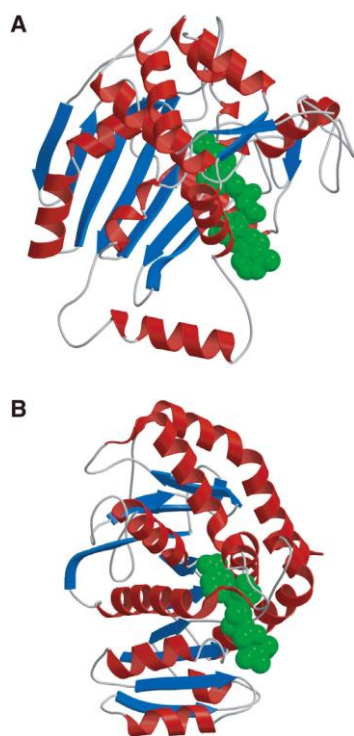


Рис. 10. Структура субъединиц НАДФ-зависимой оксидоредуктазы из *Pseudomonas syringae* (А) и МДГ, содержащей характерный мотив укладки Россмана из *E. coli* (В): α -спирали и слои β -листа показаны красным и синим цветом соответственно; молекулы НАДФ⁺ (А) и НАД⁺ (В) обозначены зеленым цветом.

Очень мало известно об олигомерных МДГ. В результате олигомеризации функциональных единиц фермента *in vivo* могут

формироваться структуры более высокого порядка, существующие в виде гексамерных и даже октамерных форм. Например, МДГ из *Nitzschia alba* состоит из восьми идентичных субъединиц [219].

НАД-зависимая МДГ всегда считалась основным ферментом, окисляющим малат в цикле лимонной кислоты [212]. Однако недавно была описана малат:хинон-оксидоредуктаза (МХО, ЕС 1.1.99.16), которая имеет важное значение при функционировании ЦТК *Corynebacterium glutamicum* [73]. МХО представляет собой флавин-адениндинуклеотид (ФАД)- и липид-зависимый белок периферической мембраны, катализирующий окисление L-малата в оксалоацетат. Белок, вероятно, связан с мембраной посредством слабых ионных или гидрофобных взаимодействий. Электроны передаются в ЭТЦ на уровне хинонов. Реакция, по существу, необратима. У *C. glutamicum* и *E. coli* активны одновременно и МХО, и цитоплазматическая НАД-зависимая МДГ. Молекулярная масса малат:хинон-оксидоредуктазы из *Bacillus sp.* составила 660 кДа, масса субъединицы – около 66 кДа. Эти результаты показывают, что молекула фермента состоит из десяти субъединиц с одинаковой массой. Однако фермент из *Mycobacterium phlei* имеет мономерную структуру (молекулярная масса 51-55 кДа) и в значительной степени отличается от фермента из *Bacillus sp.* [21].

1.3. Роль малатдегидрогеназы в адаптации клеточного метаболизма галофильных прокариот и системы защиты от стрессовых факторов

1.3.1. Адаптационные структуры геномов и протеомов галофильных микроорганизмов

Галофильные прокариоты представляют собой уникальные микроорганизмы, которые способны выживать, развиваться и успешно функционировать в экстремальных условиях солености. Выявление и анализ определенных высокомолекулярных характеристик галофилов дает

представление о механизмах адаптации к средам с высоким содержанием солей и имеет важное значение для потенциального применения в области белковой инженерии [81, 131].

Сравнительный анализ геномов и протеомов негалофильных и галофильных видов показывает некоторые общие тенденции у последних, которые выходят за пределы филогенетического родства и геномного GC-содержания. К общим механизмам макромолекулярной адаптации (на протеомном уровне) солеустойчивых организмов можно отнести: конвергентную эволюцию по отношению к конкретной структуре протеома, которая характеризуется низкой гидрофобностью; избыточную представленность кислых остатков; более низкую склонность к образованию альфа-спиральных областей вторичной структуры [12, 49, 70, 90, 93, 104, 111, 156, 170, 176, 199, 210, 211]. На геномном уровне избыточная представленность динуклеотидов GA, AC и GT частично может быть связана со специфическими требованиями к аминокислотам, в то время как обилие CG динуклеотидов выступает дополнительной сигнатурой стабильности ДНК при высокой концентрации соли. Использование синонимичных кодонов у галофилов также, по-видимому, сошлось к единой модели [15, 75, 77, 85, 111, 116, 131, 200, 222].

Универсальность молекулярных адаптаций экстремальных солелюбивых организмов подтверждает идею конвергентной эволюции галофильных видов по отношению к определенному геному и аминокислотному составу, независимо от их варьирующего GC-содержания и широко разнородных таксономических позиций [131].

1.3.2. Сравнительное исследование сольватационной оболочки МДГ и ее роль в галоадаптации прокариот

Стабильная и уникальная нативная структура белка является необходимым условием его надлежащего функционирования [15, 102].

Очевидный путь к достижению белковой стабильности – выбор и организация аминокислотных остатков в их первичной последовательности специфическим или селективным образом. Некоторые работы определяют явление повышенной частоты встречаемости отрицательно заряженных остатков на белковых поверхностях как одну из наиболее выдающихся особенностей галофильных видов [131, 210, 211].

Кластеризация по относительному содержанию различных аминокислотных остатков показывает четкую сегрегацию галофильных организмов от негалофильных (рис. 11).

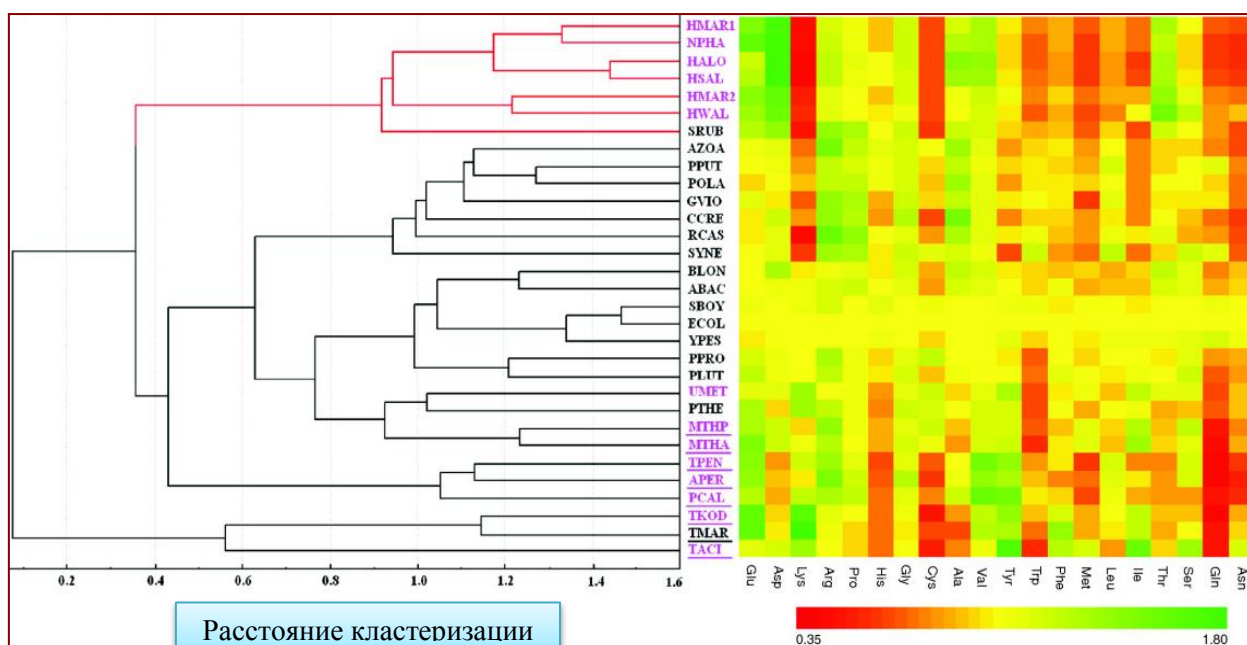


Рис. 11. Кластеризация галофильных организмов. Первые 6 сверху – облигатно галофильные виды с полностью секвенированными геномами, ниже расположены негалофильные организмы. Виды архей обозначены розовым цветом; виды, приспособленные к высоким температурам, подчеркнуты (Paul, 2015).

Левая часть рисунка показывает среднюю кластеризацию по относительному содержанию различных аминокислотных остатков в

кодируемых белках из 6 галофильных и 24 негалофильных видов из различных фил бактерий и архей с сопоставимым GC-содержанием (минимизация филогенетического влияния и эффекта мутационных отклонений на их нуклеотидные/аминокислотные паттерны) относительно *E. coli* (расстояние кластеризации - евклидово расстояние). Правая часть предлагает графическое представление относительного использования аминокислот в исследуемых организмах. Поскольку содержание остатков увеличится с 0.35 до 1.80, цвет соответствующих блоков меняется с красного на зеленый. То есть, чем зеленее цвет, тем более многочисленным является данный аминокислотный остаток по сравнению с *E.coli*. Среди заметных тенденций - значительное увеличение Asp, Glu, Val, и Thr и снижение Lys, Met, Leu, Ile, и Cys в протеомах галофилов.

Сравнительный анализ двух ортологичных тетрамерных МДГ из галофильных и негалофильных бактерий показал, что существует тесная связь между растворимостью белка, обогащением протеома кислыми аминокислотными остатками и сольвацией [19].

Поверхность МДГ (обогащенная кислыми остатками) у бактерий *Salinobacter ruber*, способных накапливать высокие концентрации KCl в цитоплазме и осуществляющих адаптивную стратегию, подобную стратегии галоархей, отвечает за благоприятное изменение растворимости белка в экстремальных условиях. Высокий уровень кислотности протеома также характерен и для галофильных *Halorodospira*, которые не аккумулируют KCl [20, 38, 40, 50, 78, 129, 139, 175, 211].

В случае негалофильных *Chloroflexus aurantiacus*, кристаллическая структура МДГ демонстрирует наличие многочисленных молекул воды в сольватной оболочке. Они не могут образовывать водородные связи с белком вокруг поверхностей неполярных остатков и организуются в виде многоугольников [19, 78]. Напротив, преобладание кислых аминокислот у *S. ruber* благоприятствует прямой водородной связи с водой, нарушая

пентагональные сети. В результате происходит реорганизация боковых цепей консервативных остатков и изменяются свойства гидратной оболочки, что представляет собой выгодную эволюционную инновацию [39, 50] (рис. 12).

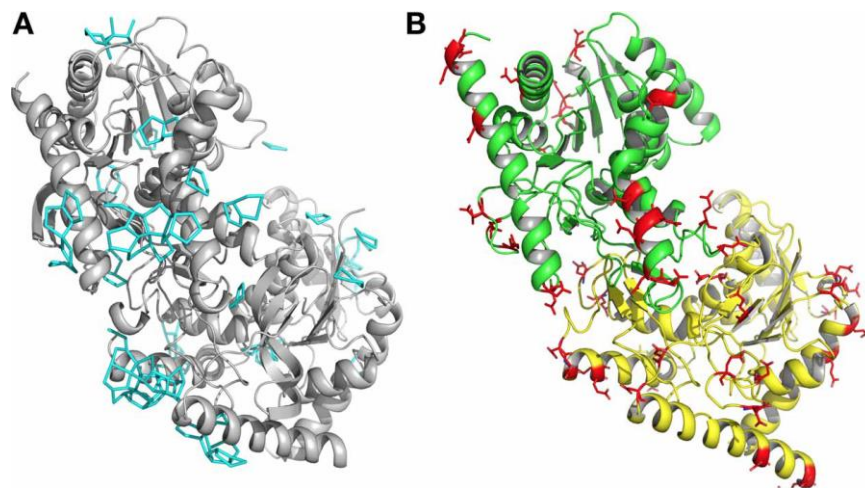


Рис. 12. (А): мономеры МДГ из *Ch. aurantiacus*. Многоугольные структуры молекул воды представлены синими линиями. (В): мономеры (зеленый и желтый) МДГ из *S. ruber*. Поверхностные кислые аминокислоты показаны красным цветом (Talon, 2014).

Гидратная оболочка МДГ из *Ch. aurantiacus* состоит из 945 молекул воды на димер А-В, которые формируют крупные сети посредством пентамерных/гексамерных структур. Для эквивалентного димера из *S. ruber* этот показатель составляет 680 молекул [19]. Только 5 из 14 молекул воды, находящихся в каталитическом центре галофильного белка, организованы в виде единственного наблюдаемого пятиугольника. В ортологичной МДГ присутствует дополнительная молекула, которая образует второй пятиугольник рядом с первым (рис. 13, 14).

Таким образом, использование отрицательно заряженных аминокислот приводит к организации гидратированной солевой ионной сети на поверхности полипептида [19, 131]. Данная стратегия позволяет поддерживать высокую растворимость при молярной концентрации

различных солей, т. к. химический потенциал сольватирующей оболочки и основного белка уравниваются [89].

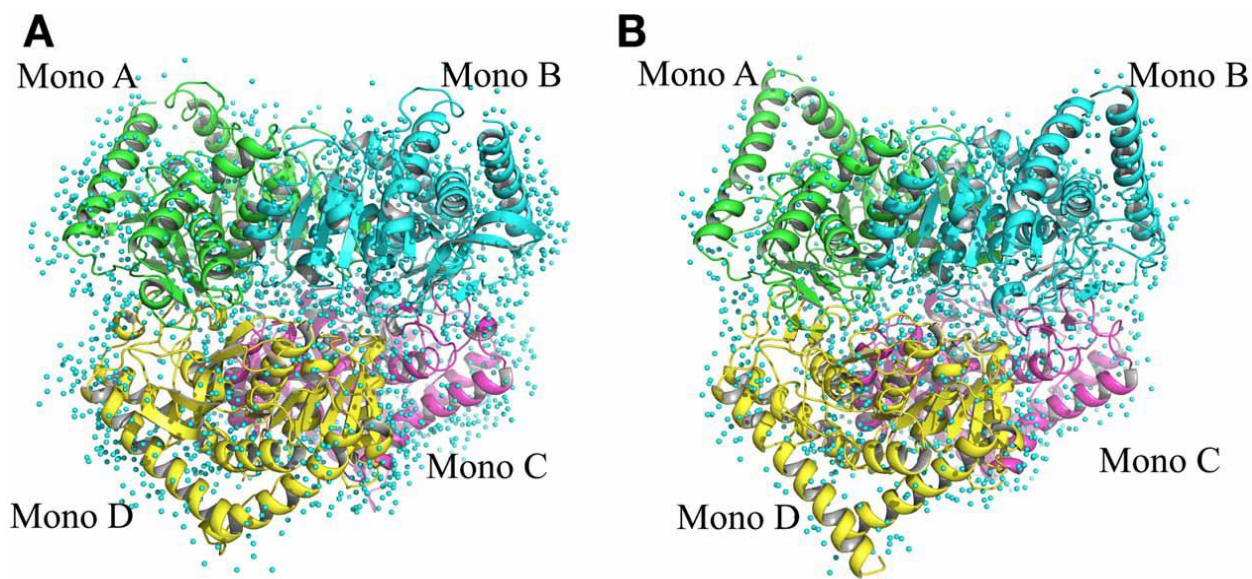


Рис. 13. Кристаллическая структура тетрамерных МДГ из *Ch. aurantiacus* (A) и *S. ruber* (B). Мономеры представлены четырьмя различными цветами. Молекулы воды показаны в виде маленьких голубых сфер (Talon, 2014).

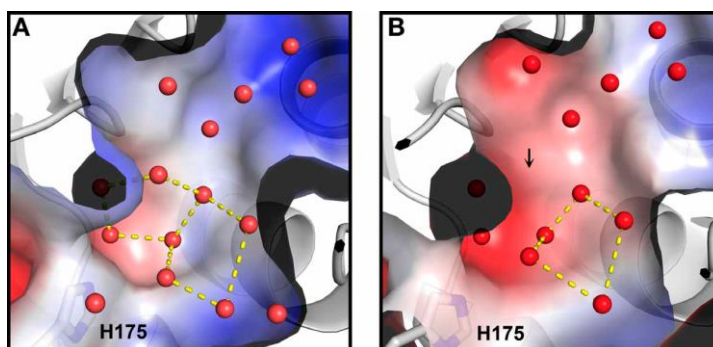


Рис. 14. Каталитический сайт МДГ из *Ch. aurantiacus* (A) и *S. ruber* (B). Молекулы воды показаны в виде маленьких красных сфер. Черная стрелка указывает на отсутствующую молекулу воды у *S. ruber* (Talon, 2014).

Когда малые растворенные вещества при отсутствии соли исключены из сольватирующей оболочки, например, в случае тетрамерной МДГ из

галофильных микроорганизмов *Haloarcula marismortui*, она сильно обеднена и выглядит как гидратная.

Так, в среде с низким уровнем солености белки фотосинтезирующей пурпурной бактерии *H. halophila* способны нормально функционировать, и кислотность протеома в данном случае обусловлена не стабилизирующими взаимодействиями между ионами K^+ и боковыми цепями кислых аминокислот, а необходимостью поддержания достаточной степени сольватации и гидратации поверхности белка через сильно гидратированные карбоксилаты [20, 27, 198, 209]. Баланс стабильности и подвижности биомолекул сохраняет их функциональное состояние и играет важную роль в адаптации к экстремальным условиям среды обитания [89].

1.3.3. Анализ специфики вторичной белковой структуры галофильных МДГ

Галофильные белки эволюционировали таким образом, чтобы быть более гибкими, но упорядоченными, и демонстрируют отличный состав вторичной структуры для предотвращения агрегации и/или потери функции [131].

В полипептидах с более высоким процентом спиральной структуры наблюдается повышенная плотность упаковки, что придает большую жесткость [70]. Напротив, у галофильных видов показана более высокая вероятность возникновения случайных участков вторичной структуры в виде образующих клубок областей (“coil”). Возможными причинами этого явления могут служить большее использование остатков Asp, чем Glu (т. к. Glu благоприятен для формирования альфа-спирали) и недостаточная представленность больших гидрофобных (Leu, Met) и положительно заряженных (Lys) аминокислот [12, 49, 131, 155, 170].

Для сравнительного анализа была выбрана одна пара кристаллических

структур МДГ из галофильного микроорганизма *Haloarcula marismortui* и его негалофильного ортолога *Chlorobium vibrioforme* [131]. Вторичные структуры этих белков рассчитывались с помощью программы MolMol. Показано заметное снижение (43.7%) образования спиральных участков вторичной структуры МДГ из *H. marismortui* по сравнению с энзимом из *Ch. vibrioforme*. Уменьшение таких областей в галофильных полипептидах делает их более гибкими, представляя собой общую стратегию механизма макромолекулярной адаптации к экстремальным условиям среды с высокой концентрацией солей. Сравнение выровненных аминокислотных последовательностей с помощью программного обеспечения DSSP служит подтверждением данной идеи (рис. 15).

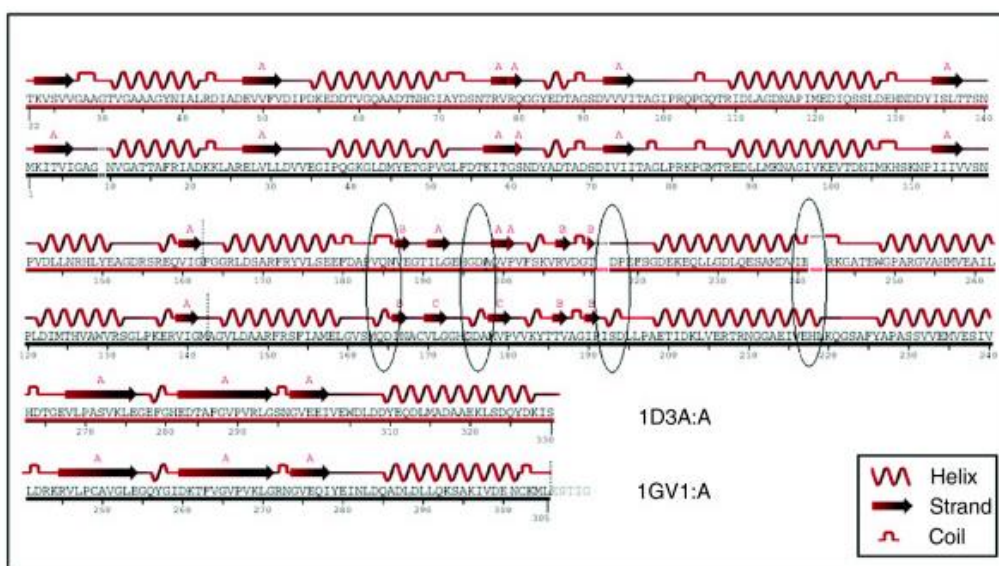


Рис. 15. Сравнение участков вторичной структуры выровненных ортологичных последовательностей МДГ из *H. marismortui* (1D3A) и *Ch. vibrioforme* (1GV1). Изменения вторичной структуры галофильного (красная линия) и негалофильного (черная линия) белка отмечены овалами, области разрыва обозначены пунктирными линиями (Paul, 2015).

1.3.4. Кислород как фактор стресса и его роль в метаболизме аэротолерантных и анаэробных микроорганизмов

Резкие изменения природных условий способны оказывать сильное влияние на механизмы регуляции клеточного метаболизма прокариот и обуславливают как большую гибкость метаболических процессов, так и выработку различного рода биохимических адаптаций к неблагоприятным условиям существования.

Одним из стрессовых факторов, воздействию которого постоянно подвергаются бактерии в природных экосистемах, является содержание в среде кислорода. Оксигенация земной биосферы $3.5 \cdot 10^9$ лет назад предоставила благоприятные возможности для энергетических и биосинтетических процессов, но и угрозу [36].

Благодаря своему положительному окислительно-восстановительному потенциалу, молекулярный кислород является одним из наиболее важных реагентов в биогеохимических циклах. Растворимость кислорода в воде довольно низкая. При атмосферном давлении и температуре 25°C содержание O_2 на литр – около 250 мкМоль; это значение уменьшается с повышением температуры и солености [36]. Значительно лучше O_2 растворим в органических растворителях (обычно в 7–8 раз), поэтому существует высокая вероятность его концентрирования в мембранах бактериальных клеток.

Наиболее изучены примеры адаптации микроорганизмов к жизни на окси-аноксигенных поверхностях раздела среди бактерий, вовлеченных в цикл серы. В течение многих лет сульфатредуцирующие прокариоты считались строгими анаэробами, однако в настоящее время установлено, что они имеют ряд специфических дифференцированных реакций на кислород. Во-первых, многие сульфатредуцирующие бактерии образуют агрегаты, что приводит к более высокой толерантности к действию O_2 . Во-вторых, по крайней мере, виды *Desulfovibrio* мигрируют в ответ на повышение

концентрации кислорода в окружающей среде. В-третьих, многие, особенно быстрорастущие виды, осуществляют дыхание на кислороде [164, 215].

Виды *Desulfovibrio* могут делиться один раз, но длительное воздействие O_2 останавливает рост и обычно приводит к образованию удлинённых клеток, что может быть результатом инактивации ферментов, участвующих в клеточном делении. Бактерии дышат кислородом до его истощения, а затем начинают расти анаэробно [36, 164]. Многие кислород-толерантные анаэробы хорошо адаптированы для выживания при оксидативном стрессе. Однако самым интригующим явлением представляется недавно обнаруженная способность бактерий, обычно считающихся «строгими анаэробами», осуществлять энергетический метаболизм в присутствии или даже на основе молекулярного кислорода. Был выявлен новый путь утилизации кислорода у *Desulfovibrio sp.*, связывающий окисление НАДН с восстановлением O_2 . Эта цепь переноса электронов содержит два уникальных белка, НАДН-рубредоксин-оксидоредуктазу и новую концевую O_2 -редуктазу; а также включает белок рубредоксин [17, 54, 164, 186, 213, 217].

Важное значение в исследованиях токсичного действия кислорода на компоненты клеток имеют свободные радикалы, образующиеся при окислении восстановленных соединений посредством O_2 или биологически, или спонтанно [68]. Свободные радикалы обладают неспаренным электроном на внешних орбиталях, что делает их очень реакционноспособными и потенциально токсичными для клеточных структур. Они могут реагировать с рядом мишеней, вызывая повреждения клеток и приводя к генерации дополнительных радикалов: взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами клеточных мембран инициирует перекисное окисление липидов с образованием так называемых «перекисей липидов», являющихся мощными ингибиторами различных ферментов. Свободные радикалы также могут повреждать клеточные белки и мембраны, ДНК, вызывать сульфгидрильное окисление белка, деполимеризацию мукополисахаридов и

нарушать выработку АТФ. Восстановленные формы O_2 оказывают прямое воздействие на конкретные компоненты дыхательных путей, такие как железо-серные белки или терминальные оксидазы, которые автоокисляются при воздействии высоких парциальных давлений кислорода [178].

Благодаря большей растворимости в липофильных средах, молекулярный кислород может быть особенно сконцентрирован в клеточных мембранах, где свободные радикалы являются более долгоживущими. Имеются данные о специфическом повреждении мембран замороженных и/или лиофилизированных бактерий; например, к ним относятся индуцируемые кислородом изменения мембранной проницаемости и связанного с мембраной комплекса инициации ДНК [68].

Наиболее распространенным механизмом антиоксидантной защиты являются детоксикация с участием супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, пероксидазы, которые принимают участие в превращениях, приводящих к конечному нетоксичному продукту – воде, и снижают уровни свободных радикалов; а также наличие антиоксидантов, таких как глутатион и α -токоферол.

Штаммы почти всех основных таксонов микроорганизмов были исследованы на активность супероксиддисмутазы и, за очень немногим исключением, содержали один или несколько белков СОД. Все известные ферменты СОД являются стабильными гидрофильными гомодимерами или тетрамерами с Cu, Fe или Mn в качестве кофакторов. Эукариоты обычно содержат Cu-Zn-содержащие ферменты, Mn-СОД обнаруживаются практически во всех митохондриях и у многих прокариот, а Fe-СОД – преимущественно в бактериальных цитосолях либо самостоятельно, либо вместе с Mn-СОД. Все Mn-СОД проявляют сходство по размеру, активности и физико-химическому поведению. N-концевые аминокислотные последовательности четырех микобактериальных белков показали большее сходство с митохондриальными, чем с другими прокариотическими Mn-СОД. Такое структурное сходство рассматривается как подтверждение

эндосимбиотической теории. Полные аминокислотные последовательности митохондриального энзима из клеток кур и *E. coli* демонстрируют 80% гомологии. Однако не существует связи между цитозольными и митохондриальными ферментами, обнаруженными в одной и той же эукариотической клетке. Следовательно, Cu-Zn-СОД в цитозолях эукариот и Mn-СОД и/или Fe-СОД в митохондриях, хлоропластах и у микроорганизмов развивались отдельно. Fe- и Mn-СОД настолько похожи, что у *E. coli* образуются гибридные димеры, содержащие по одной субъединице данных ферментов [178].

E. coli является факультативным анаэробом и содержит две супероксиддисмутазы - конститутивный Fe-белок в периплазме и Mn-фермент в цитозоле, синтез которого индуцирован кислородом. Величина общей активности СОД может быть увеличена от 4–6 единиц на мг белка в анаэробных клетках до более 50 единиц/мг белка в присутствии O_2 . Аналогичные зависимости индукции энзима в ответ на воздействие повышенных концентраций кислорода наблюдались у *Streptococcus sp.*, *Bacteroides fragilis*, *Propionobacterium shermanii*, *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio cholerae*, *Oscillatoria limnetica* и других микроорганизмов. Так, *Streptococcus faecalis*, культивируемый в аэробных условиях, обладал большей удельной активностью (УА) супероксиддисмутазы (в 16 раз), чем при анаэробном типе роста, но не содержал каталазу. У *Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus* в присутствии кислорода наблюдалось увеличение УА и супероксиддисмутазы, и каталазы. Метаноген *Methanospirillum hungateii* является конкретным примером необходимости присутствия СОД-активности у облигатных анаэробов. Этот организм содержит НАДН-зависимую флавиновую диафоруазу, которая способна непосредственно восстанавливать O_2 до $O_2^{\cdot -}$, так что существенный поток $O_2^{\cdot -}$ генерируется внутриклеточно [178].

Каталаза представляет собой тетрамерный гемопроtein и катализирует реакцию дисмутации. Резкое увеличение уровня активности каталазы (но не

супероксиддисмутазы) было обнаружено при воздействии повышенных концентраций O_2 на клетки *Bacillus subtilis* [213].

Нет сомнений в том, что генерация как пероксида водорода, так и супероксидного аниона представляет значительную угрозу для всех бактерий, которые сталкиваются с воздействием молекулярного кислорода, усиливающуюся возможным взаимодействием этих веществ с образованием гидроксильного радикала. Максимальная степень защиты была бы предоставлена микроорганизмам, содержащим для удаления перекиси водорода каталазу и/или пероксидазу, для удаления супероксидного аниона – СОД (механизм самоликвидации), а также располагающим и другими способами безвредного тушения синглетного кислорода. Однако не все защитные механизмы доступны даже для аэротолерантных прокариот. Например, *Bacillus popilliae* является облигатным аэробом, но не имеет каталазы. Большинство строгих анаэробов полностью лишены антиоксидантных ферментов, хотя некоторые виды могут обладать каталазной и/или пероксидазной активностью, в то время как другие содержат супероксиддисмутазу [213].

Другой механизм антиоксидантной защиты – механизм «улавливания» – был впервые предложен О'Брайеном и Моррисом для *Chlostridium acetobutylicum* [145]. Они обнаружили поразительное увеличение активности растворимой НАДН-оксидазы (продуктом реакции которой является H_2O , а не H_2O_2) при воздействии кислорода на клетки и пришли к выводу, что она может быть связана с защитным поглощением кислорода. Аналогичная функция была продемонстрирована для НАДН-оксидазы из *Peptostreptococcus anaerobius*.

При воздействии кислорода воздуха рост облигатного анаэроба *Bacteroidaceae sp.* В6 продолжается в течение нескольких часов до полной остановки. Когда воздействие O_2 прекращается, организм в состоянии возобновить нормальный рост. Такая способность обусловлена присутствием

в бактериальных клетках НАДН-оксидазы, растворимой НАДФН-оксидазы и пируватоксидазы. Две пиридиннуклеотид-оксидазы восстанавливают O_2 до H_2O_2 , пируватоксидаза - до H_2O . Каталаза и пероксидаза при этом обнаружены не были [145].

Кроме того, *D. gigas* и другие строгие анаэробы оснащены альтернативными системами защиты: в качестве тушителя супероксидного анионного радикала был идентифицирован синий белок нилоредоксин, присутствующий во всех известных геномах анаэробных прокариот. Также выявлена глутатионредуктазная активность, активность гомолога эукариотического белка теплового шока (Hsp60) и каталазы [82, 164]. У *D. vulgaris*, с другой стороны, были идентифицированы системы защиты от оксидативного стресса, включающие десульфоредаксин с супероксидредуктазной активностью [123].

1.4. Молекулярно-биологические аспекты функционирования малатдегидрогеназного комплекса у бактерий

1.4.1. Молекулярные формы МДГ и их генетическая детерминация

Изоферменты малатдегидрогеназы могут служить модельной системой для изучения эволюции, распределения белков в компартментах клеток и сравнения множественных форм, вовлеченных в различные метаболические пути и процессы [26].

Исследования показали, что эукариотические организмы демонстрируют функциональное и структурное разнообразие молекулярных форм малатдегидрогеназной системы, которые обнаруживаются в различных субклеточных компартментах, таких как микротельца, митохондрии, хлоропласты (НАД- и НАД(Ф)-зависимые энзимы), цитозоль, а также и в специфических тканях у некоторых растений. Эти МДГ образуют два

подсемейства с расхождением, предшествующим происхождению эукариот. Одно подсемейство включает хлоропластный НАДФ- и НАД-специфичный цитозольный фермент, а второе объединяет ферменты, выделенные из митохондрий, микротелец и НАД-МДГ хлоропластов [26, 109].

В соответствии с различиями в субклеточной локализации, физиологической функции и коферментной специфичности, МДГ разделяются на классы. Так, у растений выделяют следующие пять классов: хлоропластный НАДФ-зависимый фермент, митохондриальный НАД-зависимый, хлоропластный НАД-зависимый, НАД-зависимую МДГ микротелец, а также цитозольный НАД-зависимый фермент. Сходство последовательностей между классами, как правило, ниже; однако сходство последовательностей одних и тех же изоформ у разных видов несколько выше. Отличие митохондриальной МДГ от фермента цитозоля объясняется тем, что общий предковый ген мог быть продублирован до вторжения бактерий в клетки первичных эукариот в соответствии с вероятным эндосимбиотическим происхождением этих органелл [26].

Демонстрируемый широкий спектр изоэнзимного состава, обусловленный мультифункциональностью МДГ, связан, прежде всего, с генетической гетерогенностью – шесть различных ядерных генов у растений и два гена у животных ответственны за биосинтез изоферментного спектра в клетках высших организмов [109].

Основным механизмом посттранскрипционной регуляции генной экспрессии, который способствует организации качественной и функциональной сложности протеома у большинства эукариот, является альтернативный сплайсинг пре-мРНК. В менее сложных организмах, таких как дрожжи, количество генов, содержащих интроны, низкое, и альтернативный сплайсинг с соответствующими функциональными последствиями встречается редко. Тем не менее, клеточную локализацию малатдегидрогеназы регулирует сплайсинговая модель. У *Saccharomyces cerevisiae* идентифицированы три гена МДГ (*mdh1*, *mdh2* и *mdh3*), каждый из

которых кодирует компартмент-специфичный фермент с определенной субклеточной локализацией. *Mdh1p* локализован в митохондриях, *mdh2p* – в цитозоле и *mdh3p* – в пероксисомах. Изоферменты показывают аминокислотную идентичность в пределах 43–50%. Более высокая степень вариации последовательностей наблюдается в областях МДГ, кодирующих домены, которые отвечают за локализацию в клетке. Например, *mdh1* кодирует 17 N-концевых аминокислот, которые отсутствуют у других изоферментов и удаляются при импорте в митохондрии [6, 11, 74, 108, 191, 195].

У *Yarrowia lipolytica* обнаружено только два гена МДГ. Один из них (*ylmdh1*) кодирует прогнозируемый митохондриальный белок, тогда как второй (*ylmdh2*) генерирует цитозольную и пероксисомальную формы, используя два 3'-сайта альтернативного сплайсинга во втором интроне. Изоформы фермента, детерминированные одним и тем же геном *ylmdh2*, были помечены флуоресцентными белками с помощью векторов экспрессии eYFP, сшитых с их N-концевыми последовательностями. Исследование мутантов, отдельно экспрессирующих две формы МДГ, подтвердило их локализацию либо в цитозольном, либо в пероксисомальном компартменте [11, 41, 71, 168].

Для некоторых видов бактерий показано, что участие МДГ в различных метаболических процессах (ЦТК, ГЦ) связано с появлением изоформ, возникающих путем структурных перестроек молекулы протеина. Образующиеся таким образом димерные и тетрамерные белковые структуры содержат идентичные субъединицы и детерминированы единственным геном *mdh* [67]. После исследования высоких уровней экспрессии тетрамерной МДГ из термофильной бактерии рода *Bacillus* было высказано предположение, что некоторые незначительные изменения в аминокислотной последовательности фермента могут приводить к изменениям на белковой поверхности, в результате чего димеры имеют большую вероятность агрегации и образуют более стабильный тетрамер. Такая димеризация

димера, по-видимому, является результатом изменения ионизации молекулы энзима [196].

Относительно недавно описан неизвестный тип МДГ, называемый малат:хинон-оксидоредуктазой, кодирующейся геном *mgo* (ранее – *yojH*). Активность МХО (и наличие *mgo*) наблюдалась у разных родов эубактерий, как грамположительных, так и грамотрицательных, но не у архебактерий или эукариот. Показано, что МДГ не подавляет экспрессию *mgo*, напротив, оба энзима из *E.coli* активны одновременно. У *Corynebacterium glutamicum* МХО является основным ферментом, катализирующим окисление малата. Открытая рамка считывания (ОРС) *yojH* (EMBL AE000310) в геноме *E. coli* демонстрирует высокое сходство (43.9% идентичных остатков) с геном *mgo* из *C. glutamicum* и была использована для сверхэкспрессии МХО в *E.coli*. Регуляция экспрессии исследована с помощью промотора из области *mgo*, слитого с репортерным геном *LacZ*. Установлено, что экспрессия *mgo* находится под катаболитным контролем и сильно регулируется источником углерода, подобно генам *mdh* и сукцинатдегидрогеназы (*sdh*). Следовательно, как и многие гены, кодирующие ферменты цепи переноса электронов, *mgo* регулируется двухкомпонентной системой ArcA-ArcB, а также, по-видимому, фазой роста микроорганизмов [21, 212].

1.4.2. Клонирование, секвенирование и экспрессия генов *mdh* бактериальных организмов

В настоящее время хорошо изучены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих ферменты малатдегидрогеназной системы из различных организмов (археи, бактерии, эукариоты) и описаны многие из их генных продуктов [179].

МДГ широко используется в филогенетическом анализе, анализе генетического разнообразия, видовых гибридов, индивидуального развития, успешно применяется в качестве маркера при ранней диагностике

устойчивости и восприимчивости к болезням растений и животных [26, 62, 118, 152].

Например, семейство генов *mdh* представлено в качестве электрофоретических маркеров в популяционной генетике и эволюционной экологии, где во многих случаях внутривидовая изменчивость фермента коррелирует с экологическими переменными [118]. Установлено, что функциональные нарушения работы ЦТК являются признаком рака, а *mdh2* (мМДГ) недавно был идентифицирован как новый ген восприимчивости феохромоцитомы и параганглиомы; его мутации с потерей функции также связаны с тяжелыми неврологическими проявлениями у детей [9, 133]. Кроме того, МДГ может служить высокоэффективным усилителем растворимости при экспрессии подверженных агрегации гетерологичных белков в бактериальных экспрессирующих системах [61].

Одним из первых у бактериальных организмов был клонирован и секвенирован ген *mdh* из *E.coli*. Фермент имеет значительную гомологию с мМДГ (например, идентичность аминокислотной последовательности составляет 59% с мМДГ свиньи), но демонстрирует более низкую степень сходства с альтернативным эукариотическим изоэнзимом, локализованным в цитоплазме (около 20% гомологии с цМДГ свиньи). Тип акцептора электронов, а также углеродного субстрата являются важными детерминантами в процессе контроля экспрессии *mdh* у *E.coli*, который осуществляется на уровне транскрипции. Предполагается, что такой контроль помогает регулировать способность клеток производить энергию и промежуточные продукты биосинтеза. Уровень экспрессии *mdh* из *E.coli* полностью согласуется с функцией белка как в циклических (ЦТК), так и в разветвленных нециклических метаболических потоках углерода [142, 154].

МДГ является одним из главных энзимов, используемых для исследования биохимической адаптации к экстремальным условиям. Чтобы выяснить важные молекулярные изменения при адаптивной реакции к низким температурам в глубоководных средах, клонировали и секвенировали

ген, кодирующий МДГ из психрофильных *Vibrio sp.* штамм 5710 и *A. arcticum*. Показано, что у *A. arcticum* МДГ состоит из 329 аминокислот и проявляет 61% идентичности с *mdh* из *Thermus flavus*. При исследовании *mdh* из глубоководной бактерии *Photobacterium species* также обнаружена одна открытая рамка считывания из 936 нуклеотидов. Кроме того, *mdh* был секвенирован у пьезофильных штаммов *Moritella* и *Shewanella*, выделенных из кишечного содержимого глубоководных рыб донных отложений [61, 156, 169, 173, 179].

Ген, кодирующий тетрамерную форму МДГ из термофильных бактерий *Bacillus species*, клонировали в плазмиде *E. coli*. Полученная нуклеотидная последовательность показала, что субъединица фермента содержит 312 аминокислот и имеет молекулярную массу 33648 Да. Была определена последовательность *mdh* из термофилов *Thermus flavus* и *Th. thermophilus* НВ8 [45, 48, 107, 152].

В результате клонирования и секвенирования гена мезофильного микроорганизма *C. vibrioforme* и умеренного термофила *Chlorobium tepidum* получены полные аминокислотные последовательности ферментов МДГ. *Mdh* этих бактерий состоит из открытой рамки считывания (930 п. н.) и кодирует 310 аминокислотных остатков, что соответствует весу субъединицы димерного фермента – 33 200 Да [43].

Установленная аминокислотная последовательность энзима из экстремальных галофильных *Haloarcula marismortui* проявляет большую гомологию с последовательностью ЛДГ из различных источников, чем с последовательностями других МДГ. Эти результаты являются первым примером успешной экспрессии галобактериального гена (*mdh* клонировали в экспрессирующем векторе *E. coli* рЕТ11а), кодирующего растворимый белок, в системе *E. coli* и восстановления функционального фермента. Таким же образом были экспрессированы и гены L-малатдегидрогеназы из аэробных метанотрофов *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z и *Methylosinus trichosporium* ОВ3b [75, 167].

МДГ может существовать в нативной, растворимой форме даже в стрессовых ситуациях, таких как тепловой шок и денатурирование белков. С ферментом связываются несколько шаперонов и, как результат, увеличивают его растворимость и эффективность фолдинга. Повышенный уровень экспрессии *mdh* может быть интерпретирован как отражение устойчивого функционирования малатдегидрогеназы в условиях теплового шока. Также сообщалось, что МДГ сверхэкспрессируется, чтобы активировать путь глюконеогенеза в ответ на осмотический стресс [37, 156, 190].

Следовательно, МДГ может служить высокоэффективным усилителем растворимости в бактериальной цитоплазме при использовании в качестве фьюжн-партнера при экспрессии подверженных агрегации гетерологичных белков в бактериальных экспрессирующих системах (например, для производства биологически активных мутантных микробных катиназ, которые представляют в настоящее время важнейшее значение для биотехнологии и коммерческих отраслей). Денатурированная малатдегидрогеназа часто применяется в качестве субстрата в экспериментах при исследовании новых функций шаперонов [61, 193].

Mdh прокариотических организмов успешно используется для определения между- и внутривидовой дивергенции (потенциальный маркер в филогении и бактериальной популяционной генетике) [118, 133].

Например, ген *mdh* был выбран для определения временной диверсификации и дивергенции рода *Aeromonas*, среди видов которого рассматриваемый ген является высококонсервативным. Также у 18 штаммов *Vibrio cholerae* среди 367 оснований *mdh* было идентифицировано только одно переменное. Установленная при анализе 150 штаммов *Aeromonas* длина нуклеотидной последовательности гена одинакова во всех случаях (936 п. н.) и практически совпадает с длиной последовательности из *E. coli* и *Salmonella typhimurium* (939 п. н.), а дивергенция рода началась около 250 млн лет назад, между пермским и триасовым периодами, когда число высших организмов на Земле значительно увеличилось. Другие исследования

генетических различий, популяционной структуры, происхождения *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* также проводились с использованием последовательностей семи генов, в том числе *mdh* [62, 64, 115, 118, 173].

МДГ широко применяется в антигенных иммуноанализах и биореакторах, регенерации НАД(Н). Было показано (вестерн-блоттинг), что МДГ из *B. abortus* S2308 является иммуногенным мембран-ассоциированным белком и ген *mdh* может использоваться в качестве маркера для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота, а очищенный рекомбинантный белок – в качестве компонента вакцины [42, 130].

Все большее внимание за экологическую чистоту (по сравнению с традиционными нефтехимическими процессами) привлекает микробное производство пропионовой кислоты (ПК) – важного ингибитора плесени – используемой в качестве консервантов для пищевых продуктов и необходимой для синтеза целлюлозного волокна, гербицидов, создания парфюмерии и фармацевтических препаратов. Выявлено, что дополнительное увеличение продукции ПК у типового штамма *Propionibacterium jensenii* достигается при сверхэкспрессии соответствующих ферментов: глицериндегидрогеназы (ГДГ), МДГ и фумаратгидратазы, а также при коэкспрессии МДГ и ГДГ [56, 58, 94, 95].

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Объект и методы исследования

2.1.1. Объект исследования

Исследование функционирования малатдегидрогеназной системы проводилось у типичных представителей АФБ – *Rhodovulum steppense* A-20s^T, устойчивых к высоким концентрациям NaCl и обитающих в содовых мелководных озерах засушливых зон юго-восточного Забайкалья, которые отличаются крайней нестабильностью гидрохимического режима и являются экстремальной средой обитания для живых организмов.

2.1.2. Методы исследования

2.1.2.1. Питательные среды для культивирования бактерий

Культивирование галоалкалофильных микроорганизмов *Rh. steppense* осуществляли аэробно в экстремальных условиях при отсутствии света с использованием питательной среды Пфеннинга (г/л): дист. H₂O; дигидрофосфат калия – 0.45; хлорид магния (× 6H₂O) – 0.45; хлорид аммония – 0.45; сульфат натрия – 0.45; хлорид калия – 0.45; хлорид кальция (× 2H₂O) – 0.1; дрожжевой экстракт – 0.25; ацетат натрия – 1.5; pH среды 8–8.5.

Концентрации вносимых в стерильную среду растворов витаминов и микроэлементов составляли 1.0×10^{-3} г/л.

Бактериальные культуры центрифугировали и получали клеточные суспензии (10 мин, 10 000 g), которые отмывали с использованием 0.01 М трис-HCl-буфера и затем замораживали.

2.1.2.2. Детекция ферментативной активности

Измерение значений величин активности МДГ проводили при 340 нм спектрофотометрическим методом (СФ-56). Фотометрическая среда, используемая для детекции активности энзима при протекании обратной реакции, содержала следующие компоненты (рН 8.5): 0.05 М буфер трис-НСl, 0.001 М оксалоацетат, 0.2 мМ НАДН.

Малатдегидрогеназную активность по прямой реакции измеряли в реакционной среде следующего состава: 0.05 М буфер трис-НСl, рН 8.5; 0.002 М малат; 0.001 М НАД⁺.

Формула для расчета активности фермента:

$$A = D \cdot V_1 \cdot \varepsilon / V_2 \cdot t,$$

где ε – пересчетный коэффициент k , равный 0.482;

D – изменение оптической плотности;

V_1 – полный объем, мл;

V_2 – внесенный объем ферментного образца, мл;

t – время в минутах.

Количество энзима, которое превращает (обратная реакция) или образует (прямая реакция) 0.001 М НАДН за 1 минуту при стандартных условиях, принимали за единицу ферментативной активности МДГ.

Активность ИЦЛ определяли при 324 нм спектрофотометрическим методом на основании детектируемого прироста оптической плотности. При этом использовали среду спектрофотометрирования следующего состава: 0.025 М буфер Tris-НСl, рН 8.5; 0.005 М хлорид магния ($\times 6\text{H}_2\text{O}$); 0.003 М изоцитрат калия; 0.005 мМ дитиотреитол; 0.005 М фенилгидразин НСl; 0.005 М этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА).

Формула расчета величин активности энзима:

$$A = D \cdot V_1 \cdot s / V_2 \cdot t,$$

где s – коэффициент поглощения (0.18);

D – изменение оптической плотности;

V_1 – полный объем, мл;

V_2 – внесенный объем ферментного образца, мл;

t – время в минутах.

Количество изоцитратлиазы, превращающее 1 мкМоль изоцитрата за 1 мин при 25°C и оптимальном значении pH, считалось ферментативной единицей активности исследуемого энзима [5].

Для спектрофотометрического определения активности каталазы при длине волны 240 нм в течение 3 минут также использовали СФ-56. Реакционная смесь содержала 0.025 М буфер Tris-HCl со значением pH 8.5 и 5-15 мкл исследуемого образца. Инициация реакции осуществлялась путем внесения 20 мкл перекиси водорода (3%).

Формула расчета величин активности энзима на мг белка:

$$A = ((\Delta D / T) \cdot X) / (L \cdot C),$$

где A – активность энзима;

ΔD – изменение оптической плотности;

T – время, сек;

X – разведение ферментативной вытяжки;

L – толщина измеренного в миллиметрах слоя;

C – содержание белка, мг (Сибгатуллина, 2011).

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) осуществляли при 560 нм в соответствии со способностью данного фермента оказывать ингибирующее влияние на фотохимический процесс восстановления

нитросинего тетразолия. При этом фотометрическая среда содержала: 0.05 М буфер Tris-HCl (pH 8.5); 0.02 М метионин; 0.08 мМ нитросиний тетразолий; 0.002 мМ рибофлавин; 0.2 мМ ЭДТА; 25 мкл исследуемой пробы. Время протекания реакции при освещении флуоресцентными лампами – 6 мин. В качестве контроля при отсутствии света использовали полную реакцию среду, инкубированную в темноте, а светового контроля – реакцию среду без фермента, в которой на свету развивалось наиболее интенсивное окрашивание (Полеская, 2004).

Количество СОД, которое принимали за ферментативную единицу активности, проявляло способность подавлять реакцию восстановления нитросинего тетразолия на 50%.

Активность СОД выражали в условных единицах на 1 мг белка и рассчитывали по формуле:

$$A = ((D_k / D_{оп}) \cdot V_o) / (D_k \cdot t \cdot V_{вн} \cdot C),$$

где A – активность энзима;

D_k – изменение оптической плотности контроля;

$D_{оп}$ – изменение оптической плотности опытной пробы;

V_o – общий объем реакционной смеси, мл;

$V_{вн}$ – объем внесения исследуемого образца, мл;

t – время, мин;

C – содержание белка, мг.

2.1.2.3. Измерение количественного содержания белка в исследуемых образцах

Для определения суммарного содержания белка в исследуемых образцах использовали классический метод Лоури, основанный на протекании биуретовой реакции и реакции Фолина.

Спектрофотометрическое измерение оптической плотности проводили при 750 нм на СФ-56.

2.1.2.4. Модифицированная схема ферментативной очистки

Для возможности исследования на электрофоретически гомогенных препаратах энзиматических характеристик трех изоформ МДГ, была разработана и проведена 4-х стадийная очистка фермента:

- I. Получение ферментативных экстрактов. Разрушение бактериальных клеток осуществляли с использованием УЗДН-2Т «ООО «НПП» Укрросприбор» (Украина) в течение 2 мин (параметры мощности: 500 Вт, частоты: 22 кГц). Фракция супернатанта была получена в результате центрифугирования (10 000 g, 5 мин) культур *Rh. steppense*. При проведении работ поддерживалась температура не выше 4°C.
- II. Стадия гель-фильтрации на сефадексе G-25. Образец ферментной вытяжки (не более 3 мл) пропусклся через колонку (G-25 «Pharmacia») размером 1.5 × 18 см для освобождения от низкомолекулярных соединений. Процесс элюции проводили буферным раствором с показателем pH 8.5.
- III. Ионообменная хроматография. Для проведения ионообменной хроматографии использовали ДЭАЭ-сефацел (размер колонки: 1.5 × 20 см) и осуществляли элюирование фермента линейным градиентом хлористого калия (150–350 мМ, шаг ступени – 5 мМ) в буферном растворе с показателем pH 8.5 (0.05 М трис-HCl).
- IV. Стадия гель-хроматографии с использованием сефадекса G-200. Измерение свободного объема готовой колонки (2 × 35 см) проводилось при пропускании 2 мл раствора голубого декстрана (0.2%). Объем образца МДГ, наносившегося на колонку (G-200 «Pharmacia»), не превышал 1.5 мл, а объем собираемых фракций составлял 1 мл. При выполнении работ были подобраны и соблюдались оптимальные условия (диапазон температур: 0–4°C).

2.1.2.5. Электрофоретические методы анализа

2.1.2.5.1. Исследование электрофоретической подвижности в нативном ПААГ

Для анализа электрофоретической подвижности и детекции новых индуцибельных изоформ МДГ был проведен электрофорез в нативном полиакриламидном геле (ПААГ). Концентрация полиакриламида при использовании крупнопористого концентрирующего ПААГ составила 3%, мелкопористого разделяющего – 7%. Внесение ферментативного образца в расчете на 1 карман пластинки не превышало 100 мкг. В качестве контроля за движением линии фронта использовали бромфеноловый синий (0.15%-й раствор). При прохождении белками концентрирующего геля сила постоянного электрического тока составила 1.5 мА в расчете на 1 ячейку ПААГ-пластинки, а разделяющего ПААГ – 2.5 мА. Продолжительность электрофоретического анализа составляла около 1.5–2 часов при 0–2°C и значении величины показателя рН буферной системы 8.0–8.2. Когда индикаторная краска достигала нижней границы геля, процесс электрофореза останавливали.

2.1.2.5.2. Анализ гомогенности энзиматических образцов

Исследование гомогенности препаратов трех олигомерных форм МДГ проводили, используя методику универсального проявления на белок с AgNO_3 [120]. Внесение ферментативного образца в расчете на 1 карман пластинки не превышало 5 мкг белка. Хранение гелей осуществлялось в 7%-ном растворе CH_3COOH .

2.1.2.5.3. Метод специфического проявления ферментов

Для специфического проявления МДГ применяли тетразолиевый метод [120]. Проявление гелей осуществляли в темноте при значении показателя рН 9.0 для повышения специфичности метода из-за возможного присутствия яблочных энзимов. Температура инкубации составляла 35–37°C, среда проявления содержала 0.05 М буфер трис-НСl; 1.5 М малат; 0.005 М НАД⁺; 0.05%-й раствор нитро-синего тетразолия (НСТ) и 0.01%-й раствор феназинметасульфата (ФМС).

2.1.2.5.4. Электрофоретический анализ в присутствии додецилсульфата натрия

Величины молекулярных масс субъединиц исследуемого энзима были установлены при помощи метода SDS-электрофореза. При этом используемая детергентная система включала следующие компоненты:

- ✚ Разделяющий гель: 12.5% акриламид; 10% SDS (додецилсульфат Na); 1.5 М буфер Tris-НСl, рН 8.8; 0.025% N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД); 10% персульфат аммония (ПСА).
- ✚ Гель для концентрирования белков: акриламид, 4%; SDS (10%); 0.5 М буфер Tris-НСl, рН 6.8; 0.025% ТЕМЕД; ПСА (10%).
- ✚ Электродный буфер, рН 8.3: 0.01 М Tris-НСl; 0.192 М глицин; 1% SDS.

Состав буферной системы (рН 6.8) для приготовления энзиматических образцов: 0.0625 М Tris-НСl; 2%-й SDS, 10%-й раствор глицерина, 5%-й β-

меркаптоэтанол и 0.001%-й бромфеноловый синий. Перед внесением препараты МДГ инкубировали при 80–85°C на водяной бане (10 мин).

Маркерные белки для построения калибровочной кривой и детекции молекулярной массы субъединиц включали (кДа): β -галактозидазу (116); БСА (66.2); овальбумин (45); лактатдегидрогеназу (35); рестриктазу Bsp98I (25); β -лактоглобулин (18.4); лизоцим (14.4).

2.1.2.6. Детекция молекулярной массы изоформ энзима

Молекулярные массы изоформ МДГ определяли с использованием метода аналитической гель-фильтрационной хроматографии (сефадекс G-200) [4]. Свободный объем колонки размером 2 × 35 см предварительно измеряли с помощью высокомолекулярного полисахарида – голубого декстрана.

Формула для расчета величин молекулярных масс исследуемых энзимов:

$$\lg M_r = 6,698 - 0,987(V_1 / V_2),$$

где V_1 – объем ферментативного выхода, мл;

V_2 – объем свободный, мл.

2.1.2.7. Масс-спектрометрический анализ МДГ

Масс-спектрометрические измерения проводились с использованием комплекса «Протеом человека» (Институт биомедицинской химии, Россия, Москва). Протеиновые полосы, соответствующие исследуемым молекулярным формам МДГ в геле, обрабатывали *in situ* модифицированным трипсином [120]. Масс-спектрометрический пептидный

фингерпринт-анализ выполнен на масс-спектрометре Ultraflex II MALDI TOF (Bruker Corporation, Bremen, Germany).

2.1.2.8. Исследование кинетических характеристик и регуляции активности ферментов

Изучение каталитических свойств изоформ МДГ проводилось на гомогенных препаратах. Были установлены значения величин констант Михаэлиса, субстратного ингибирования и ингибирования цитратом. Для построения графиков использовались компьютерные программы, позволяющие проводить обработку полученных данных соответствующими методами [2].

Температурные оптимумы были установлены на основании анализа величин активности изоформ фермента в интервале температур среды спектрофотометрирования от 0 до 80°C. Для исследования влияния температуры на стабильность молекулы МДГ фермент инкубировали при различных значениях температуры и измеряли его активность за 1; 5; 10; 15 и 20 мин в среде калориметрирования при 25°C.

2.1.3. Молекулярные исследования

2.1.3.1. Выделение геномной ДНК и суммарной клеточной РНК

Геномную ДНК выделяли с использованием набора ПРОБА-ГС («ДНК-Технология», Россия) согласно рекомендациям производителя. Для выделения суммарной РНК применяли реагент ExtractRNA («Евроген», Россия).

2.1.3.2. Расчет концентрации РНК в пробе

Измерение концентрации суммарной клеточной РНК проводили на T70+UV-VIS-спектрофотометре («PG Instr. Lim.», Великобритания) при 260 и 280 нм. Длина оптического пути кюветы составила 1 см.

Для расчета значения величины концентрации РНК в растворе исходного образца была использована следующая формула (<http://www.molbiol.ru/app.html>):

$$C = (62.9 \cdot A_{260} - 36 \cdot A_{280}) \cdot P,$$

где С – значение концентрации РНК (мкг/мл) в исходном растворе;

A_{260} – значение величины поглощения при 260 нм;

A_{280} - при 280 нм;

P – разбавление раствора исходного образца.

2.1.3.3. Метод обратной транскрипции

Синтез первой цепи комплементарной ДНК осуществляли при помощи фермента M-MULV-обратной транскриптазы («Ferm.», Литва) в результате проведения процесса обратной транскрипции РНК. В качестве затравочного был использован random-праймер.

2.1.3.4. Электрофорез нуклеиновых кислот

Для анализа и оценки качества выделенных ДНК и РНК проводился электрофорез в 1% геле агарозы («Helicon», Россия). Последующая визуализация результатов осуществлялась с использованием трансиллюминатора с длиной волны 312 нм.

2.1.3.5. Подбор вырожденных и специфических праймеров

Разработку и подбор вырожденных праймеров осуществляли с помощью анализа определенных консервативных участков нуклеотидных последовательностей, выявленных путем выравнивания и сравнения известных последовательностей гена *mdh* из бактерий различных таксономических групп (NCBI data base, <http://www.ncbi.nlm.nih.>) с использованием программного обеспечения «AliBee Multiple Alignment» (www.genebee.msu.su/service/malignreduced.html). Для исключения возможности образования димеров и элементов вторичных структур проводили проверку выбранных праймеров с использованием программы «FAST-PCR»:

прямой, 5'-CCGCTCGACGCGATGGTCTG-3';

обратный, 5'-CGTAGAAGGCCGAGCCGGTC-3'.

Подбор специфической последовательности праймеров проводили на основе сиквенса ампликона *mdh* из *Rhodovulum steppense* штамм А-20s^T с использованием программы Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi.LINK_LOC=BlastHome):

прямой, 5'-GCTTGACGCGATGGTTTGGG-3';

обратный, 5'-AGCCCATGTCCACCAGATCG-3'.

Температура отжига составила 59°C. Вырожденные и специфические праймеры были синтезированы компанией «Евроген» (Москва).

2.1.3.6. Проведение полимеразной цепной реакции

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе Терцик («ДНК-Т», Россия) с вырожденными и

специфическими праймерами использовали набор реактивов AmpliSence («Helicon», Россия) и следующие заданные параметры: 5 мин – денатурация ДНК (95°C), далее – 40 циклов: 20 с – температура 95°C, 20 с – 59°C, 30 с – 72°C и 4 мин – 72°C.

2.1.3.7. Секвенирование ПЦР-продукта

Определение нуклеотидной последовательности полученного ампликона гена *mdh* выполнено в лаборатории отдела ЗАО «Евроген» (Москва).

2.1.3.8. Проведение ПЦР-РВ

Для осуществления ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали LightCycler 96 («Roche», Швейцария), красителем при проведении процесса реакции выступал SYBR Green I. Нуклеотидные последовательности праймеров к гену *mdh*:

прямой - 5'-GCTTGACGCGATGGTTTGGG-3';

обратный - 5'-AGCCCATGTCCACCAGATCG-3'.

Заданные параметры метода: 95°C – 5 мин для осуществления денатурации, далее 40 циклов: 20 с – температура 95°C, 20 с – 59°C, 30 с – 72°C и 5 мин – 72°C. Параллельная амплификация 16S рРНК с ген-специфичными праймерами позволила контролировать количество матрицы. Как отрицательный контроль выступала суммарная РНК, не прошедшая этапа обратной транскрипции и при проведении 40 циклов амплификации накопления ПЦР-продукта не наблюдалось. Для расчета величин относительных уровней транскриптов гена *mdh* была использована следующая формула: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.1.4. Методы вариационной статистики в процессе обработки данных

Проведение экспериментов осуществлялось в пяти-восьми биологических повторностях, аналитических измерений для проб - в трех повторностях. Приведенные значения полученных данных на рисунках и в таблицах представляют собой среднее арифметическое, рассчитанное исходя из трех значений величин, определенных в опытах. Достоверность результатов, полученных в процессе исследования, устанавливали с применением методов из соответствующих разделов вариационной статистики. При обработке опытных данных использовался критерий Стьюдента. Рассматривались различия, считающиеся статистически достоверными, при $p \leq 0,05$.

2.2. Полученные результаты и их обсуждение

2.2.1. Индукция новых изоформ МДГ у бактерий *Rh. steppense* при хемотрофном типе культивирования в аэробных условиях

Галоалкалофильные микроорганизмы способны не только выживать в агрессивных и крайне неустойчивых, бедных по составу средах с высоким уровнем солености, различным содержанием кислорода, крайними значениями рН, присутствием или отсутствием света, но и успешно функционировать в данных условиях благодаря высокой степени адаптации на геномном и протеомном уровнях, а также благодаря изменениям на уровне ферментных систем [131].

У пурпурных несерных галоалкалофильных *Rh. steppense*, способных как к фото-, так и к хемотрофному росту, основным энергетическим процессом является фотосинтез, и, следовательно, анаэробные условия представляются оптимальными. При смене типа культивирования на аэробное в отсутствие света наблюдается замедление роста и размножения данных микроорганизмов.

В оптимальных условиях при анаэробном фототрофном культивировании *Rh. steppense* было выявлено наличие всего одной конститутивной изоформы малатдегидрогеназы – тетрамерной МДГ 2. Однако при хемотрофном росте бактерий в присутствии O₂ фермент МДГ характеризуется наличием трех олигомерных молекулярных форм (рис. 16). Таким образом, биосинтез двух дополнительных индуцибельных изоформ в стрессовых условиях можно считать механизмом адаптивной реакции клеточного метаболизма исследуемых микроорганизмов.

Величина электрофоретической подвижности конститутивной МДГ 2, составляет 0.51; а индуцибельных МДГ 1 и МДГ 3 – 0.43 и 0.67.

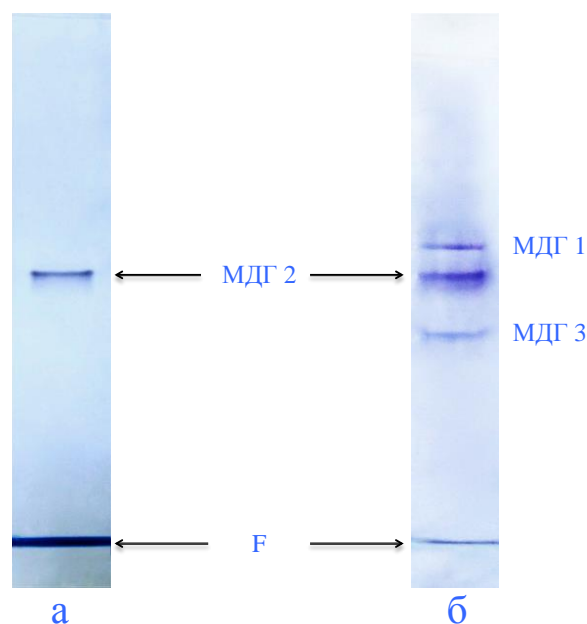


Рис. 16. Электрофореграмма изоформ малатдегидрогеназы из *Rh. steppense* при смене типов питания: а – фототрофный рост в анаэробных условиях; б – хемотрофный рост в присутствии кислорода; F – фронт бромфенолового синего.

2.2.2. Получение электрофоретически гомогенных препаратов изоформ МДГ

2.2.2.1. Многостадийная схема очистки исследуемого фермента

В результате проведения специально разработанной 4-х стадийной очистки исследуемого фермента по модифицированной схеме были получены электрофоретически гомогенные препараты олигомерных форм МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 в условиях аэробного хемотрофного роста галоалкалофильных *Rh. steppense* А-20s^Т. Данные представлены в таблице 1.

Выход ферментативной активности при проведении процесса элюции МДГ линейным градиентом хлористого К (150-350 мМ, шаг ступени – 5 мМ), наблюдался в виде трех пиков. При этом концентрация хлорида калия в

результате десорбции МДГ 1 составила 138 мМ, МДГ 2 – 158 мМ и МДГ 3 – 180 мМ.

Таблица 1.

Очистка трех олигомерных форм малатдегидрогеназы
из *Rh. steppense* A-20s^T, (n = 3, p ≤ 0.05)

Название стадии	Значение величины общего V, мл	Значение общей активности, Е	Количество белка, мг	Значение удельной активности, Е/мг	Величина степени очистки	Процентное выражение выхода	
Гомогенат	3	28.96	297.84	0.097	1.00	100.00	
Полученный супернатант	2.8	27.72	259.23	0.107	1.10	95.72	
Гель-хроматография (G-25)	2	25.38	143.07	0.177	1.83	87.64	
Ионообменная хроматография (ДЭАЭ-сефацел)	1	2	5.19	0.83	6.253	64.46	17.92
	2	2	13.37	2.25	5.942	61.26	46.17
	3	2	7.23	1.02	6.990	72.06	24.97

Величина удельной активности полученных в конечном итоге гомогенных препаратов трех молекулярных форм составила: 6.253 Е/мг белка – для МДГ 1; 5.942 Е/мг – для МДГ 2 и для МДГ 3 – 6.990 Е/мг белка. Степень очистки – 65, 61 и 72 раза, соответственно.

Из анализа литературных данных известно, что у бактерий *Rh. rubrum* значение удельной активности для малатдегидрогеназы – 2.3 Е/мг белка, у *Rh. palustris* величина данного показателя составляет 5 Е/мг, а у *Vulcanithermus medioatlanticus* – 7 Е/мг белка [100, 101].

2.2.2.2. Анализ гомогенности энзиматических препаратов МДГ

Гомогенность трех ферментных препаратов изоформ МДГ, полученных в результате проведения многостадийной очистки, устанавливали методом аналитического электрофореза белков в нативном ПААГ. Для каждого из трех полученных пиков малатдегидрогеназной активности при универсальном проявлении с AgNO_3 была выявлена одна полоса с величиной относительной электрофоретической подвижности для МДГ 1 – 0.43, для МДГ 2 – 0.51 и 0.67 – для МДГ 3. Одна единственная полоса активности МДГ также была обнаружена при специфическом проявлении исследуемых олигомерных форм энзима (рис. 17).

2.2.2.3. Значения молекулярной массы исследуемых изоформ фермента

Значения величин молекулярных масс нативных МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 из *Rh. steppense* А-20s^T, определенные методом аналитической гель-фильтрационной хроматографии, составили, соответственно: 280, 142 и 72 кДа.

2.2.2.4. Анализ субъединичного строения молекулярных форм МДГ

Для выявления особенностей структурной организации исследуемых олигомерных молекулярных форм использовали метод SDS-электрофореза в 12.5%-ном ПААГ. Результаты электрофоретического исследования (рис. 18,

19), свидетельствуют о том, что молекулы МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 состоят из идентичных субъединиц со значением молекулярной массы (MW), равным 35.06 кДа

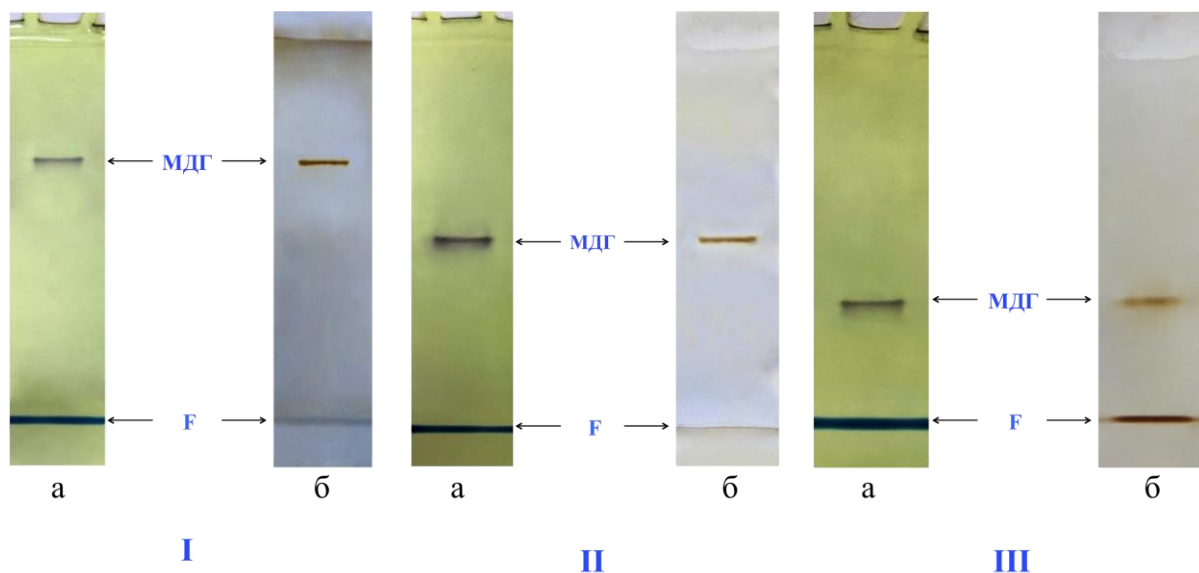


Рис. 17. Электрофоретическое исследование изоформ МДГ из бактерий *Rh. steppense* A-20s^T в нативном ПААГ: I – МДГ 1, II – МДГ 2, III – МДГ 3; а – окрашивание тетразолиевым методом; б – проявлении с AgNO₃; F – фронт красителя.

Приведенные в представленной диссертационной работе результаты согласуются с литературными данными. Некоторые установленные значения MW для субъединиц МДГ из бактерий различных таксономических групп составляют: 33 (*Rhodovulum sulfidophilum*), 35 (*Streptomyces avermitilis*, *Methylomicrobium alcaliphilum*, *M. trichosporium*), 37 (*Rh. sphaeroides*, *Streptomyces coelicolor*), 39 (*Leucothrix mucor*), 40 (*Beggiatoa leptomitiformis*), 45 (*Rh. palustris*) и 46 кДа (*Macromonas bipunctata*) и т. д. [53, 66, 91, 100, 119, 166, 167].

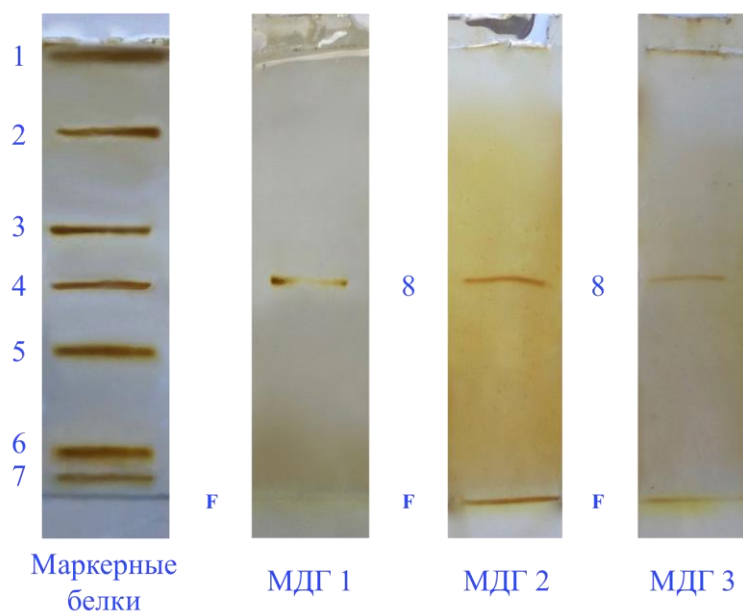


Рис. 18. Электрофоретический анализ исследуемых изоформ МДГ из бактерий *Rh. steppense* в SDS-ПААГ: 1 – β -галактозидаза (116 кДа); 2 БСА (66 кДа); 3 – овалбумин (45 кДа); 4 – лактатдегидрогеназа (35 кДа); 5 – рестриктаза Bsp981 (25 кДа); 6 – β -лактоглобулин (18 кДа); 7 – лизоцим (14 кДа); 8 – МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3; F – фронт красителя.

Сравнительный анализ результатов электрофоретического исследования в SDS-ПААГ и аналитической гель-фильтрационной хроматографии свидетельствует об индукции у *Rh. steppense* октамерной, тетрамерной и димерной изоформ МДГ в условиях аэробного культивирования в темноте (табл. 2). При анаэробном росте исследуемых бактерий в присутствии света единственная изоформа МДГ 2 была представлена гомотетрамером.

Наличие трех олигомерных форм, состоящих из одинаковых субъединиц, но отличающихся величинами молекулярных масс нативных полипептидов, является важной структурной особенностью малатдегидрогеназы при хемотрофном типе культивирования *Rh. steppense* в условиях оксидативного стресса.

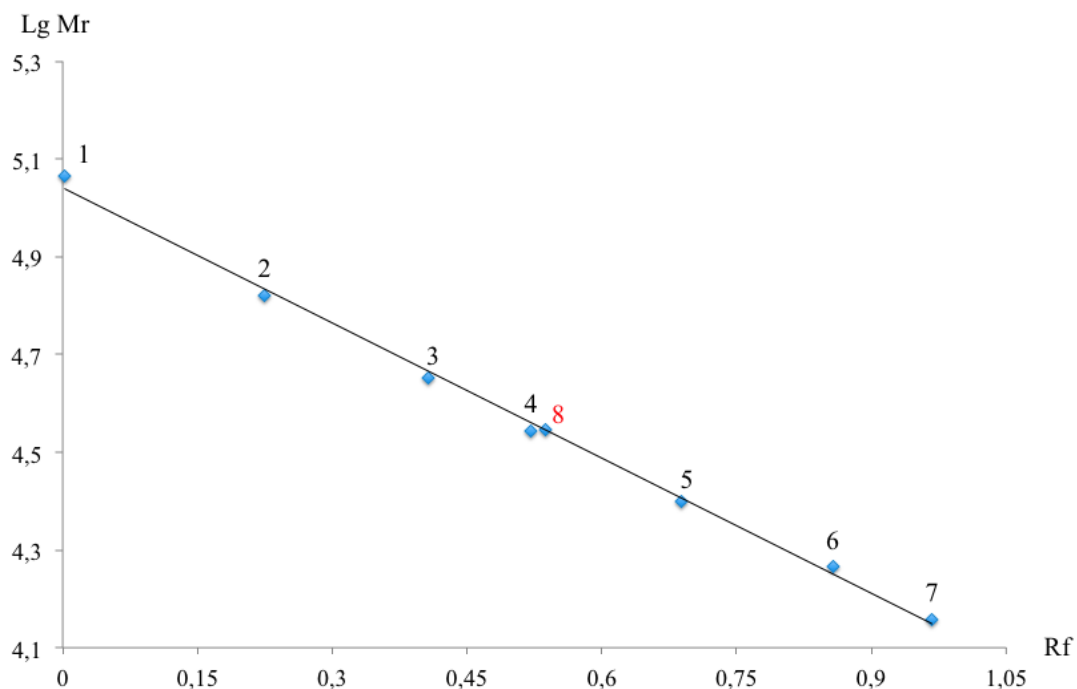


Рис. 19. Калибровочная кривая для детекции молекулярной массы субъединиц МДГ (8) из *Rh. steppense*: 1–7: белки-маркеры молекулярной массы; 8 – исследуемый фермент; F – фронт красителя.

Представляется интересным, что трансляция гена *mdh* из *Rh. sulfidophilum* указывает на ЛДГ-подобную МДГ (характеризуется тетрамерным строением), состоящую из 320 аминокислот с MW субъединицы 33 кДа.

Из литературных источников известно (Тайеh М. А., Madigan М. Т.), что *Rhodobacter capsulatus*, *Rh. rubrum* и *Rhodomicrobium vannielii* образуют тетрамерные МДГ, тогда как *Rhodocyclus purpureus* – димерные формы. Проведенные исследования энзима из *Rh. sphaeroides* и *Rh. palustris* с помощью гель-фильтрационной хроматографии показали, что фермент обоих видов являлся тетрамером [92, 189].

Структурные свойства изоформ МДГ из *Rh. steppense* A-20s^T

Объект	Молекулярная масса, кДа	Количество субъединиц	Молекулярная масса субъединиц, кДа
МДГ 1	280	8	35.06
МДГ 2	142	4	35.06
МДГ 3	72	2	35.06

Представляется интересным, что трансляция гена *mdh* из *Rh. sulfidophilum* указывает на ЛДГ-подобную МДГ (характеризуется тетрамерным строением), состоящую из 320 аминокислот с MW субъединицы 33 кДа. Из литературных источников известно (Tayeh M. A., Madigan M. T.), что *Rhodobacter capsulatus*, *Rh. rubrum* и *Rhodomicrobium vannielii* образуют тетрамерные МДГ, тогда как *Rhodocyclus purpureus* – димерные формы. Проведенные исследования энзима из *Rh. sphaeroides* и *Rh. palustris* с помощью гель-фильтрационной хроматографии показали, что фермент обоих видов являлся тетрамером [92, 189].

Сравнение аминокислотных последовательностей широкого диапазона энзимов малатдегидрогеназной системы показало, что тетрамерные МДГ из фототрофных и других бактерий группируются на дендрограмме вместе с лактатдегидрогеназами, и их общее сходство последовательностей с ЛДГ значительно выше, чем с другими МДГ [182].

Таким образом, тетрамерные МДГ широко распространены среди фототрофных пурпурных видов бактерий. Кроме того, было установлено, что молекула малатдегидрогеназы из *Nitzschia alba* состоит из восьми идентичных субъединиц [219].

Возникновение ферментов как с низким, так и высокомолекулярным весом у разных групп прокариот не является чем-то необычным, хотя большинство грамтрицательных бактерий, изученных до настоящего времени, имеют димерные МДГ [219].

2.2.3. Идентификация пептидов МДГ методом масс-спектрометрии

Идентификация пептидов МДГ масс-спектрометрическим методом (пептидный фингерпринт-анализ, Peptide Mass FingerPrint, PMF) служит подтверждением присутствия идентичных субъединиц в составе изоформ энзима. Пептидный фингерпринт-анализ трех исследуемых олигомерных форм МДГ выявил наличие одинаковых m/z -пигов в каждом образце (рис. 20).

Были идентифицированы по меньшей мере пять масс пептидов – продуктов высокоспецифического ферментативного гидролиза, уникальных для каждого белка, с величинами m/z , равными: 602.3, 937.7, 1075.6, 1119.5 и 1246.5 для всех трех препаратов. Полученные результаты указывают на наличие идентичных наборов масс пептидов после гидролиза *in situ*, соответствующих масс-спектрометрической пептидной карте каждой изоформы малатдегидрогеназы из *Rh. steppense*.

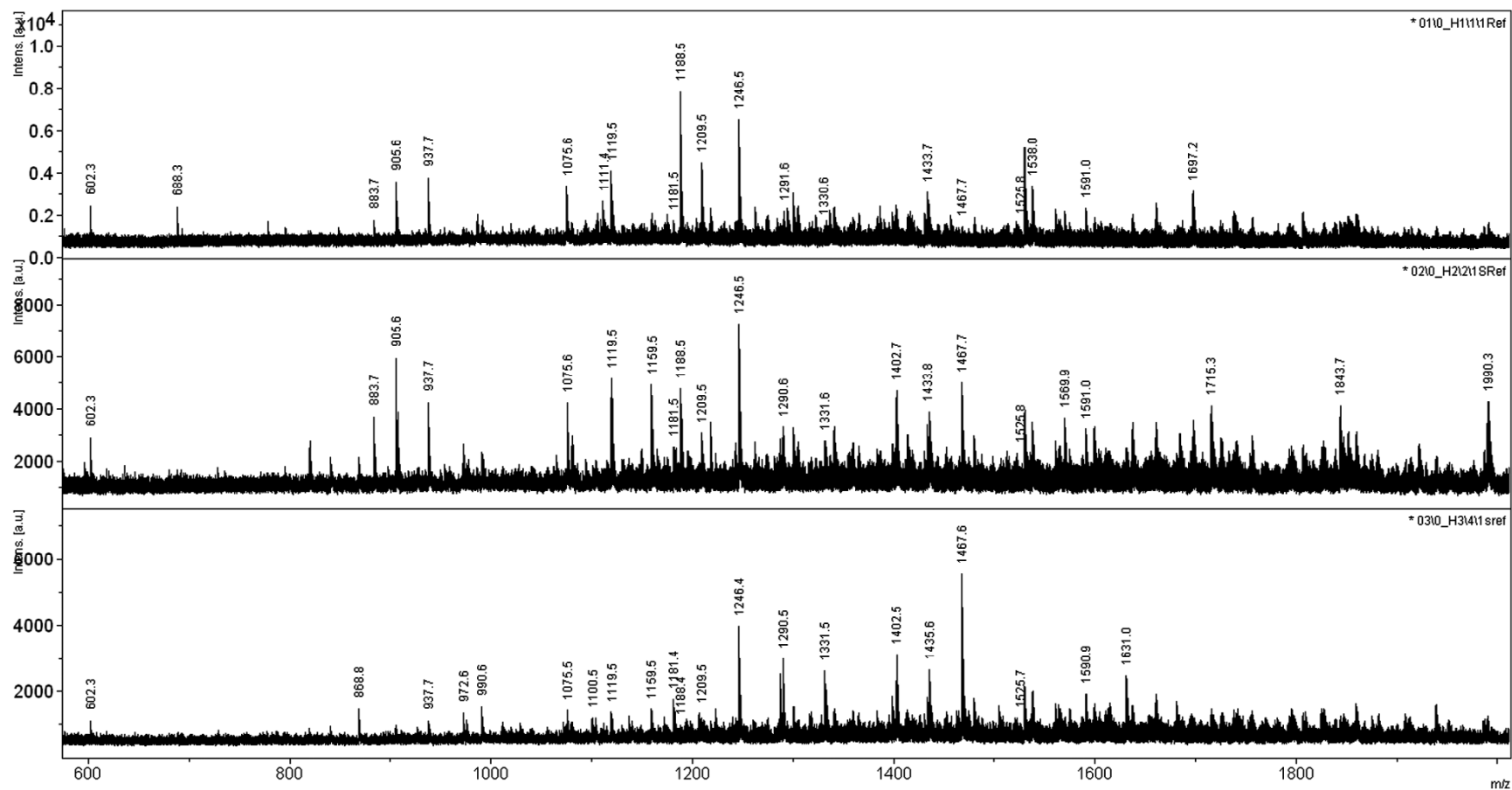


Рис. 20. Масс-спектрометрическая пептидная карта исследуемых изоформ МДГ (PMF после высокоспецифического ферментативного гидролиза *in situ* очищенных белковых полос олигомерных форм энзима в SDS-ПААГ) из бактерий *Rh. steppense*. Сверху вниз: МДГ 1, МДГ 2, МДГ 3.

2.2.4. Некоторые кинетические характеристики и регуляция активности изоформ МДГ

2.2.4.1. Исследование влияния различных концентраций H^+ -ионов на энзиматическую активность

На гомогенных препаратах были определены кинетические и регуляторные параметры для трех олигомерных изоформ МДГ. Исследование влияния на активность малатдегидрогеназы различных концентраций H^+ -ионов позволило установить значения величин рН-оптимумов обратной и прямой реакции, которые составили: 9.5 и 10.5 для октамерной МДГ 1; 8 и 9 для тетрамерной МДГ 2, 8.5 и 9.5 для димерной МДГ 3 (рис. 21, 22). Проявление максимальной каталитической активности всех трех молекулярных форм фермента при более щелочных значениях рН является характерной особенностью функционирования малатдегидрогеназной системы. Отличные показатели оптимальных значений рН при протекании реакции в прямом и обратном направлениях обусловлены способностью молекулы МДГ принимать различные конформационно-структурные состояния при окислении и восстановлении субстратов.

2.2.4.2. Расчет значений величин констант Михаэлиса-Ментен

В результате проведенных исследований были установлены значения величин K_m энзима (методом Лайнуивера-Берка) к различным субстратам для трех олигомерных молекулярных форм МДГ (рис. 23–28). Полученные значения представлены в табл. 3.

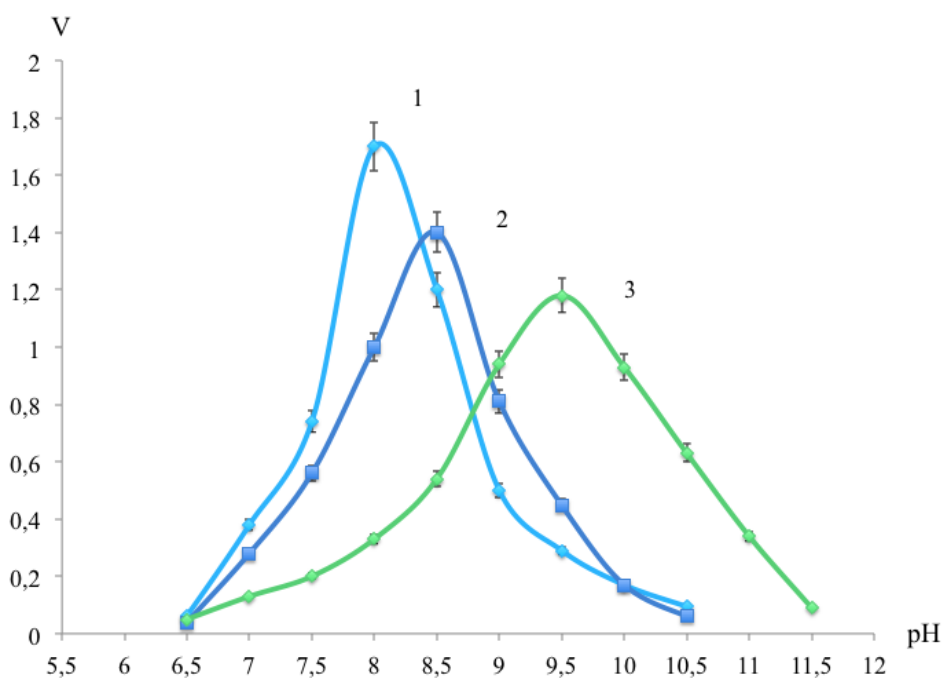


Рис. 21. Графическое представление зависимости активности изоформ исследуемого энзима от рН среды из *Rh. steppense* (обратная реакция): 1 – МДГ 2; 2 – МДГ 3; 3 – МДГ 1.

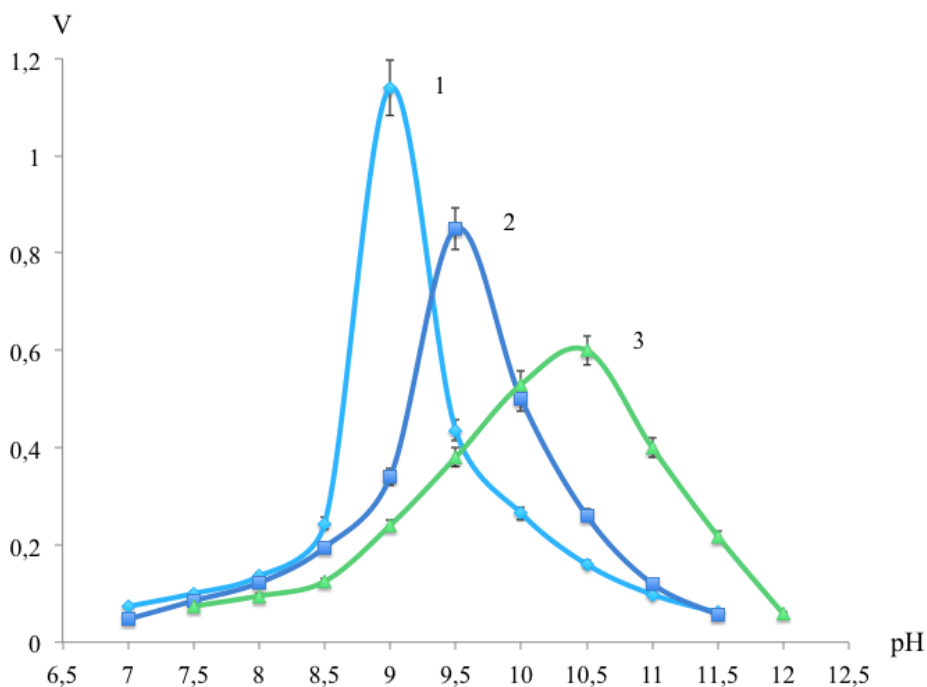


Рис. 22. Графическое представление зависимости активности изоформ исследуемого энзима от рН среды из *Rh. steppense* (прямая реакция): 1 – МДГ 2; 2 – МДГ 3; 3 – МДГ 1.

Кинетические константы для изоформ МДГ из *Rh. steppense* A-20s^T

Кинетические константы, мкМ	МДГ 1	МДГ 2	МДГ 3
K_m по оксалоацетату	200.0	35.0	52.0
K_m по НАДН	135.0	66.7	82.9
K_m по малату	943.4	2200	1766.8
K_m по НАД ⁺	250.0	107.3	127.2

Октамерная МДГ 1, согласно анализу экспериментальных данных, проявляет максимальное сродство к малату и минимальное – к оксалоацетату, что может иметь важное значение для ее специфического участия в трансформации метаболических потоков у *Rh. steppense* при осуществлении адаптивной реакции к условиям оксидативного стресса и хемотрофному типу культивирования.

Предпочтение реакции окисления L-малата изоформой МДГ 1 способствует образованию ОА, выполняющего функцию антиоксиданта. Также данный ферментативный признак соответствует высокой потребности в синтезе аспартата – предшественника основного осмопротектора эктоина у галофильных видов бактерий. Кроме того, было показано, что дополнительным осмолитом может служить глутамат. Конденсация ОА с ацетил-КоА (с образованием цитрата) способна усиливать окислительную ветвь неполного ЦТК, где синтезируется 2-оксоглутарат (предшественник глутамата) [167]. Таким образом, МДГ 1 может принимать участие в процессах синтеза осмолитов при отсутствии продуктов фотосинтеза, азотном обмене, глюконеогенезе.

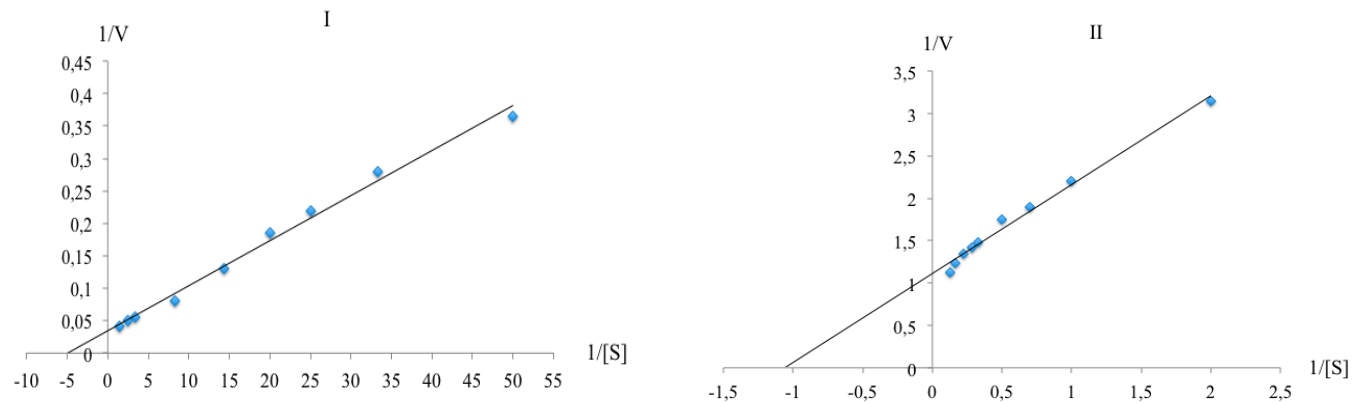


Рис. 23. Расчет значений K_M для МДГ 1 из *Rh. steppense*: I – по обратной реакции (по ОА); II – по прямой реакции (по малату).

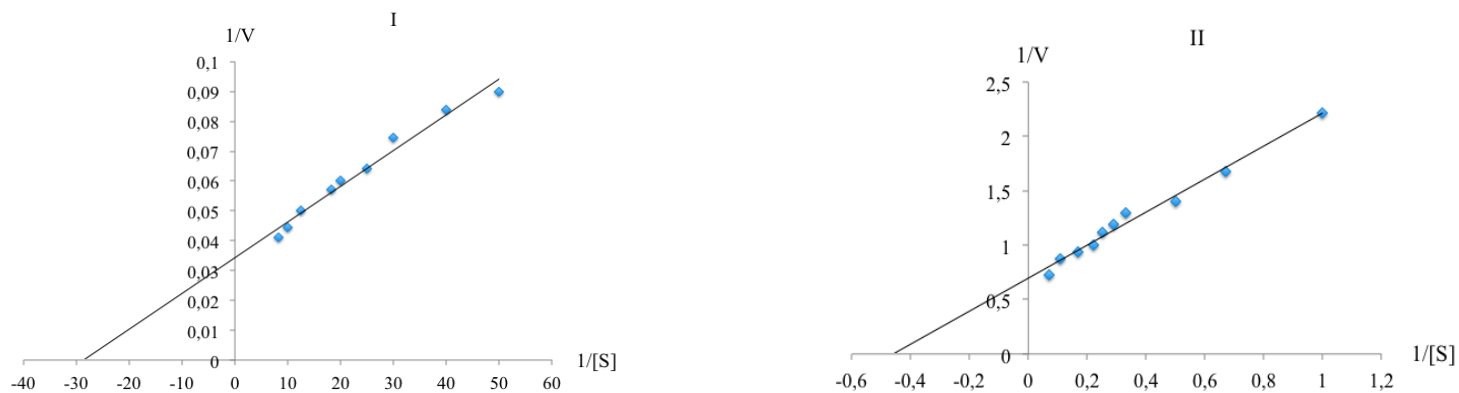


Рис. 24. Расчет значений K_M для МДГ 2 из *Rh. steppense*: I – по обратной реакции (по ОА); II – по прямой реакции (по малату).

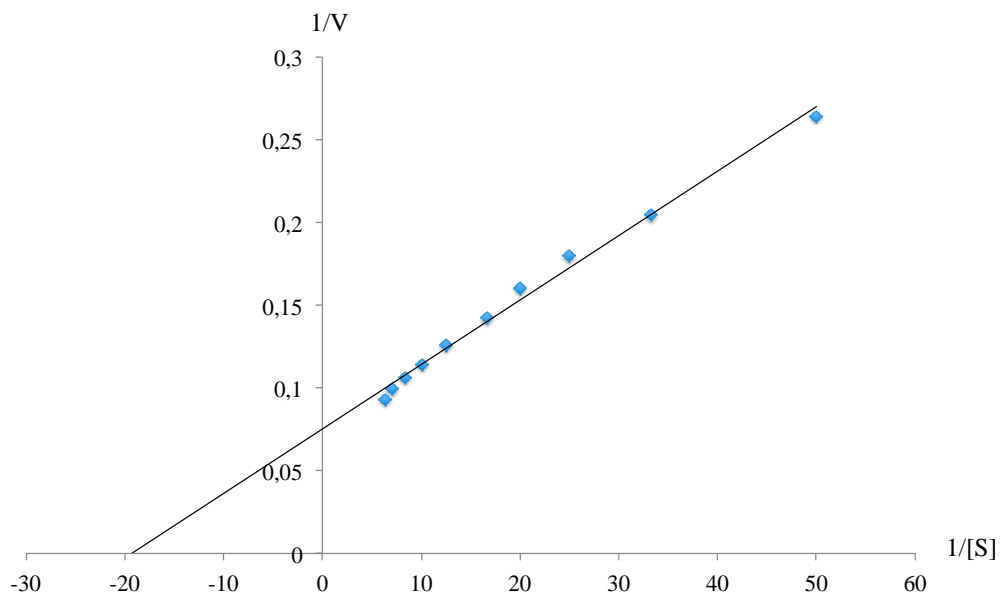


Рис. 25. Расчет значений K_M для МДГ 3 из *Rh. steppense* по обратной реакции (по ОА).

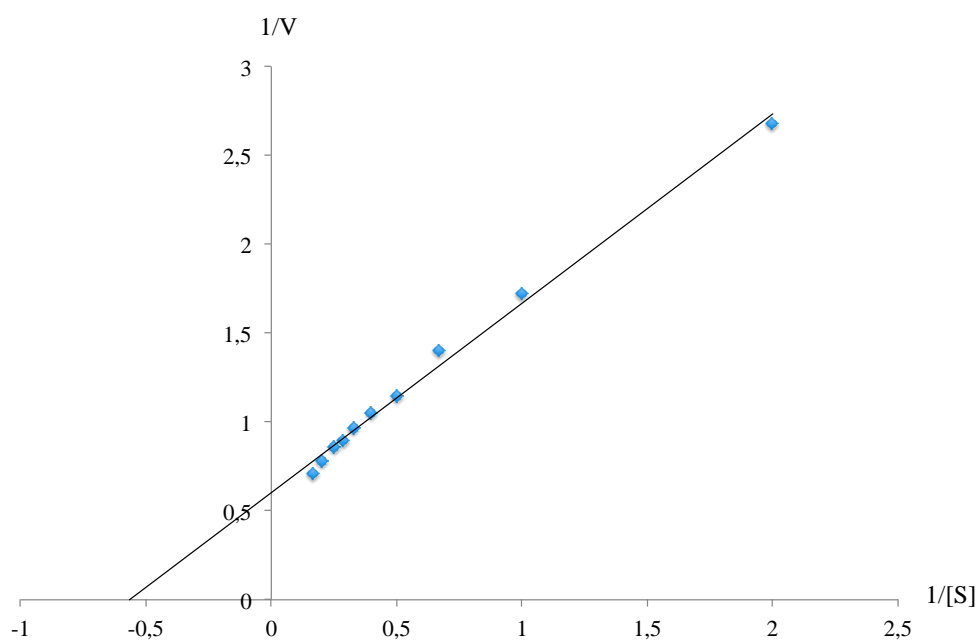


Рис. 26. Расчет значений K_M для МДГ 3 из *Rh. steppense* по прямой реакции (по малату).

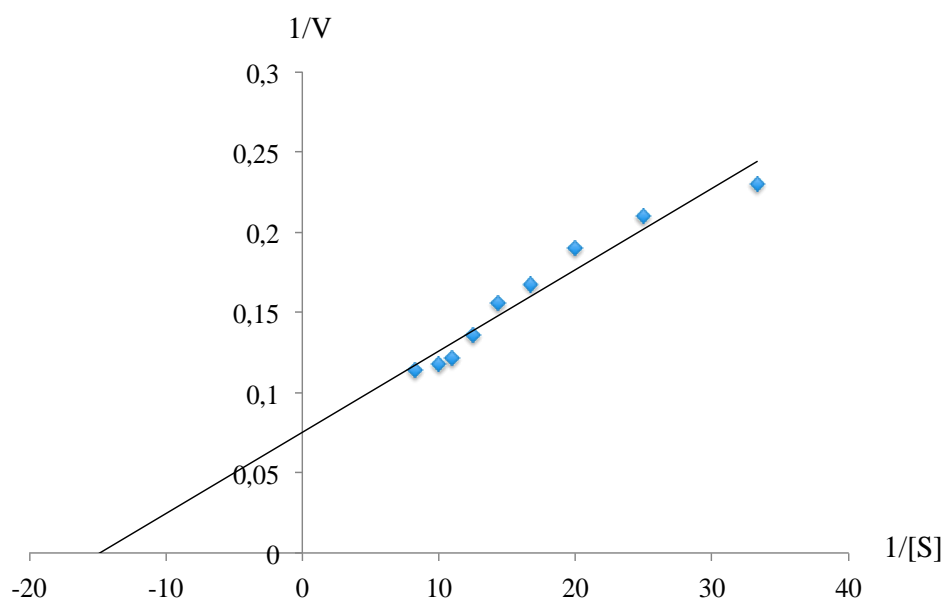


Рис. 27. Расчет значений K_M по НАДН для МДГ 2 из *Rh. steppense*.

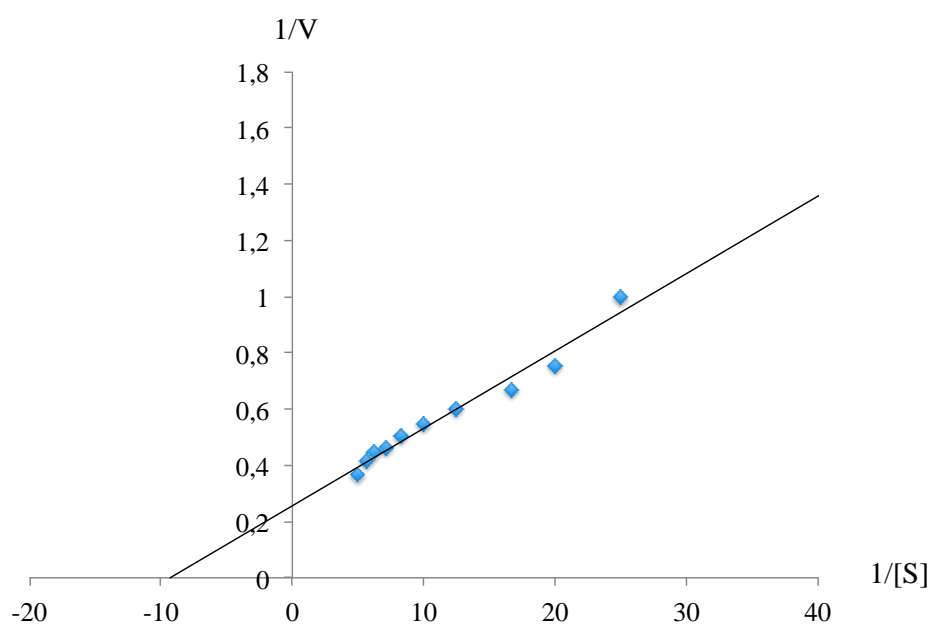


Рис. 28. Расчет значений K_M по НАД⁺ для МДГ 2 из *Rh. steppense*.

Сравнительный анализ значений K_M , определенных для МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3, позволяет сделать вывод, что все три изоформы малатдегидрогеназы демонстрируют высокое сродство к оксалоацетату и более низкое (при протекании прямой реакции) – к малату, что обусловлено

определенными изменениями структуры молекулы белка и принятием соответствующей конформации в процессе превращения различных субстратов [149]. Результаты настоящей работы согласуются с данными, полученными в других исследованиях. Например, значения кинетических констант для МДГ из различных микроорганизмов по ОА составляют (мкМ): 30 (*B. alba*), 39 (*S. natans*), 40.8 (*Rh. sphaeroides*), 44 (*E. coli* L305C), 49 (*E. coli* WT), 57 (*Corynebacterium glutamicum*), 59 (*M. trichosporium*), 76 (*St. avermitilis*), 85 (*Rh. capsulata*) [66, 142, 149, 154, 166, 184]. Близкие значения K_m по малату определены для МДГ из *E. coli* WT, *E. coli* L305C, *M. trichosporium* и *Talaromyces emersonii*: 2.6 мМ, 1.4 мМ, 1.28 мМ, 1 мМ [91, 142, 166].

При исследовании кинетических констант по НАД⁺ и НАДН из *Rh. steppense* была выявлена более высокая степень сродства трех олигомерных молекулярных форм малатдегидрогеназной системы к последнему коферменту. При этом представленные в табл. 3 значения K_m согласуются со значениями других констант по НАД⁺ и НАДН, определенных для МДГ из различных групп бактерий [91, 142, 166, 184].

2.2.4.3. Расчет величин констант субстратного ингибирования для изоформ МДГ

Было продемонстрировано ингибирующее действие высоких концентраций ОА на каталитическую активность исследуемой МДГ и определены значения констант субстратного ингибирования (K_i) для трех изоформ энзима (метод Диксона).

Для МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 из *Rh. steppense* A-20s^T установлены следующие величины K_i : 8, 1.92 и 2.21 мМ (рис. 29–31). Об ингибирующем влиянии высоких концентраций ОА на ферменты малатдегидрогеназной системы сообщается и в работах других авторов. Так, некоторые известные значения K_i для МДГ составили (мМ): 1.3 (для *St. avermitilis*), 2.4

(*Sphaerotilus natans*), 2.6 и 3.2 (*B. leptomitiformis*), 5.8 (*St. coelicolor*), а фермент из *St. aureofaciens* не был чувствителен к высоким концентрациям рассматриваемого субстрата [66, 91, 166, 184].

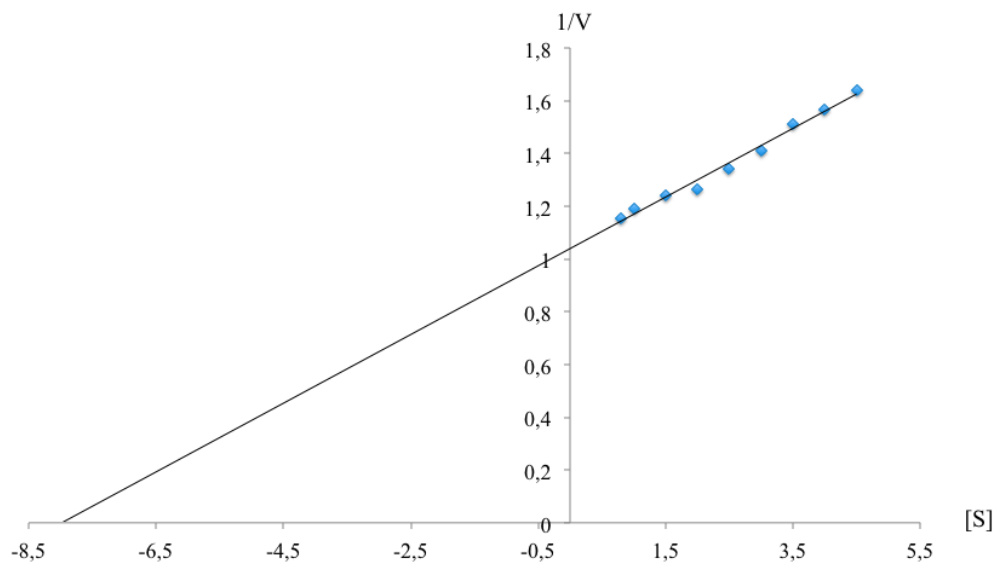


Рис. 29. Расчет K_i (по ОА) для МДГ 1 из бактерий *Rh. steppense*.

Значение K_i для октамерной изоформы МДГ 1 значительно превышает аналогичные характеристики для тетрамерной и димерной форм исследуемой малатдегидрогеназной системы и может играть важную роль в трансформации метаболических потоков *Rh. steppense* при смене типа питания и условий культивирования. Проявляющая максимальную устойчивость к ОА МДГ 1, по-видимому, дает возможность при отсутствии продуктов фотосинтеза накапливать данную кетокислоту, являющуюся известным осмолитом, в аэробных условиях роста микроорганизмов.

Таким образом, изученные структурно-функциональные характеристики и рассчитанные кинетические параметры для МДГ из *Rh. steppense* подтверждают заключение о специфической функциональной роли каждой из олигомерных форм энзима в адаптивной реакции клеточного метаболизма галоалкалофильных бактерий.

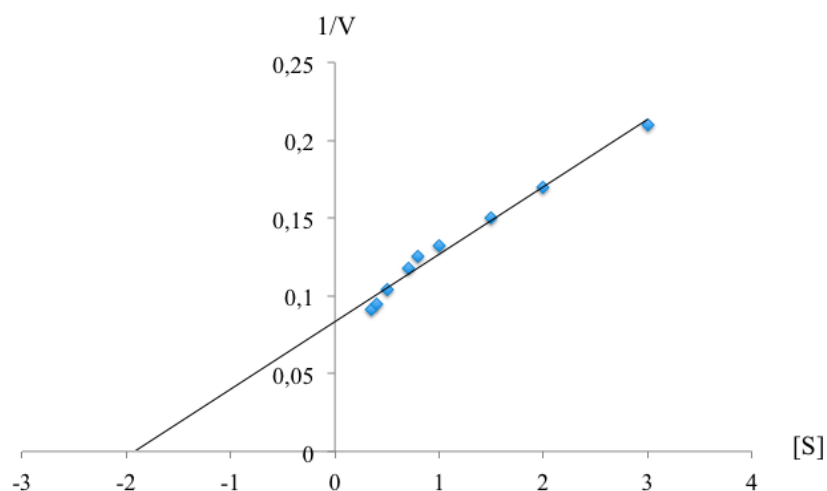


Рис. 30. Расчет K_i (по ОА) для МДГ 2 из бактерий *Rh. steppense*.

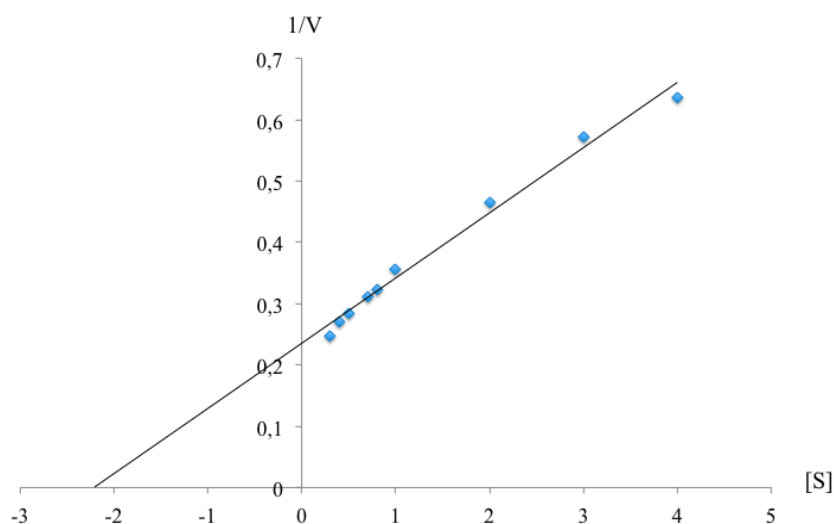


Рис. 31. Расчет K_i (по ОА) для МДГ 3 из бактерий *Rh. steppense*.

2.2.4.4. Действие различных концентраций катионов металлов на каталитическую активность МДГ

Обеспечивая адекватное протекание метаболических реакций в условиях клетки, ферменты малатдегидрогеназной системы подвергаются регуляторному воздействию многих соединений, примерами которых могут служить ионы металлов, а также интермедиаты различного происхождения. Катионы одно- и двухвалентных металлов способны оказывать

стабилизирующий эффект и повышать каталитическую активность МДГ, способствуя сохранению целостности клеточного метаболизма бактерий в стрессовых условиях. Наиболее выраженным действием обладают ионы магния, широко распространенные во внутриклеточном пространстве. Установлено, что Mg^{2+} выступает активатором деятельности многих энзимов, превращающих и образующих фосфорные соединения, органические кислоты, углеводы, играет заметную роль в обеспечении энергетических процессов [66].

В результате проведенного исследования было показано, что присутствие в среде катионов магния в пределах концентраций от 0.02 до 50 мМ приводило к активации трех изоформ МДГ из *Rh. steppense* A-20s^T по конкурентному типу. Рассчитанные значения K_a молекулярных форм составили: 5.076 (МДГ 1), 8.065 (МДГ 2) и 4.7 мМ (МДГ 3). Отсутствие существенных различий в механизме регуляторного воздействия Mg^{2+} на исследуемые изоформы может быть обусловлено их формированием в результате олигомеризации идентичных субъединиц, что не приводит к значительным изменениям в структуре активных центров.

В то же время ионы Mn^{2+} выступают в качестве бесконкурентного ингибитора каталитической активности МДГ (рис. 33–34).

Для ионов кальция, по сравнению с Mg^{2+} , характерно проявление антагонистического действия (подавление работы ферментов, активируемых ионами магния). Синергистами Ca^{2+} обычно являются катионы бария, так как физические и химические характеристики этих элементов считаются достаточно близкими [149].

В пределах концентраций от 2 до 50 мМ для МДГ 1; от 5 до 50 мМ для МДГ 2 и от 1 до 50 мМ для МДГ 3 ионы кальция оказывали ингибирующий эффект на активность изоформ энзима по бесконкурентному типу (рис. 35–37). Однако выявлено, что в концентрациях до 1 мМ Ca^{2+} являлся активатором (бесконкурентный тип) каталитического действия олигомерных форм МДГ.

На рис. 35–37 продемонстрировано ингибирование фермента катионами Ba^{2+} (0.04–40 мМ) по конкурентному типу: значения K_i для МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 составили 11.4; 9.2; и 16 мМ.

При исследовании регуляторного влияния различных концентраций ионов одновалентных металлов было обнаружено, что Na^+ не оказывает существенного влияния на активность МДГ из галофильных *Rh. steppense*, тогда как K^+ (0.05–100 мМ) – активирует все три изоформы ферментной системы по неконкурентному типу (рис. 38). Следовательно, катионы калия способны взаимодействовать с функциональными группами аминокислот, не входящими в состав активного центра белка, что, по-видимому, приводит к определенным конформационным изменениям каталитического сайта и способствует увеличению скорости реакции. Константы активации для МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 составили: 3.62 мМ, 4.00 мМ и 3.77 мМ.

Протекторная роль K^+ широко описана у галофильных видов микроорганизмов и распространяется на поддержание стабильности компонентов внутриклеточной среды (главным образом, ионы калия используются для стабилизации ферментов и мембранных структур) [20, 81, 89, 139].

2.2.4.5. Анализ влияния ряда интермедиатов ЦТК на каталитическую активность изоформ энзима

Некоторые интермедиаты цикла трикарбоновых кислот, являющиеся субстратами-аналогами МДГ, выступают в качестве ингибиторов ферментативной активности энзима [100]. В настоящей работе выявлено ингибирующее действие цитрата (пределы концентраций: 0.001–2 мМ, конкурентный тип ингибирования) на все три олигомерные формы МДГ из *Rh. steppense* при аэробном хемотрофном типе культивирования (рис. 39–41). Рассчитанные значения K_i составили: 0.06 (МДГ 1), 0.03 (МДГ 2) и 0.4 мМ (МДГ 3).

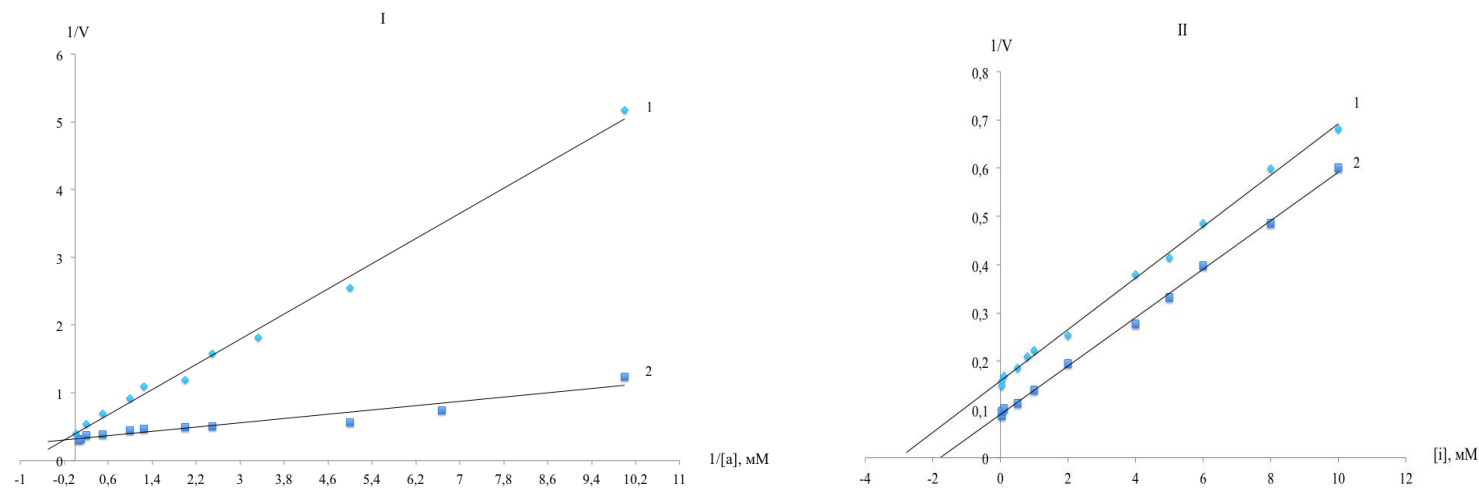


Рис. 32. Графическое представление эффекта активации и ингибирующего действия катионами металлов на каталитическую активность МДГ 1 из *Rh. steppense*: I – Mg²⁺; II – Mn²⁺; 1 – 0.05 mM ОА; 2 – 0.1 mM ОА.

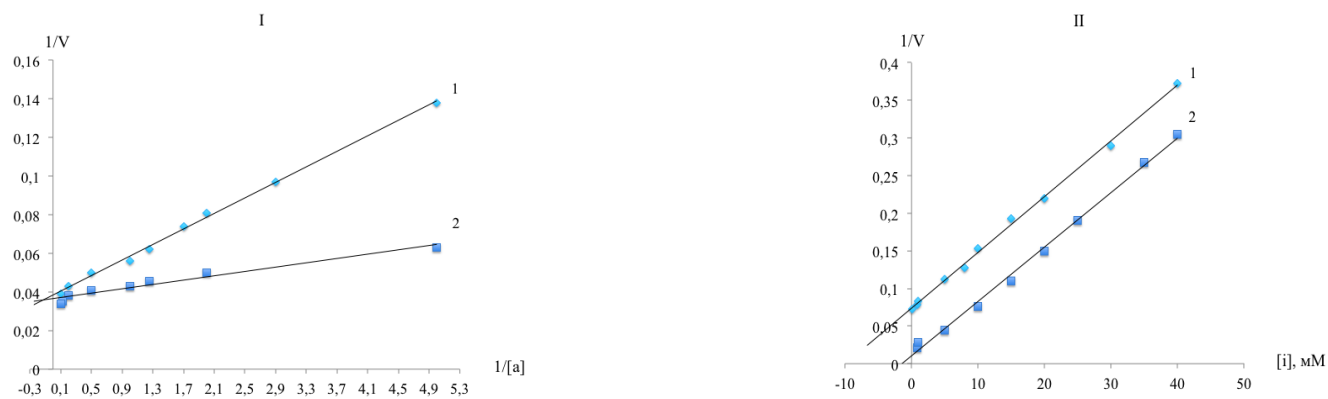


Рис. 33. Графическое представление эффекта активации и ингибирующего действия катионов металлов на каталитическую активность МДГ 2 из *Rh. steppense*: I – Mg²⁺; II – Mn²⁺; 1 – 0.05 mM ОА; 2 – 0.1 mM ОА.

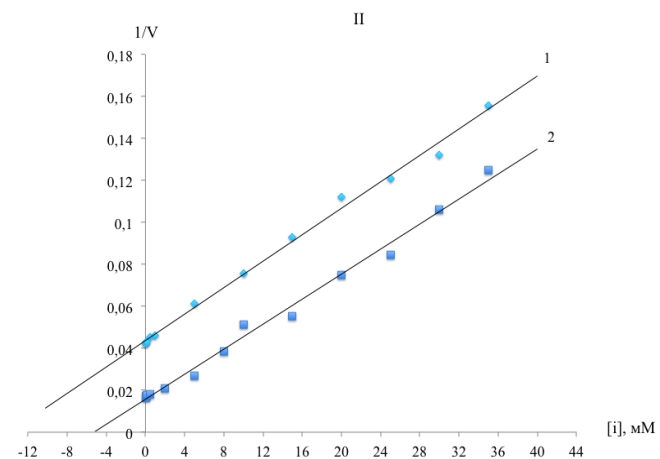
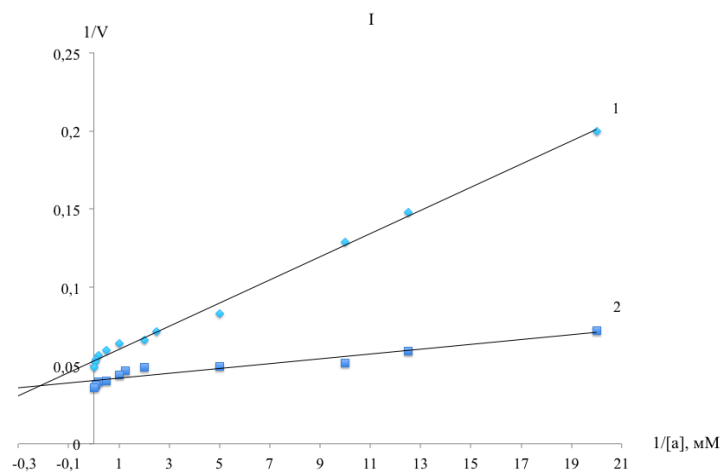


Рис. 34. Графическое представление эффекта активации и ингибирующего действия катионов металлов на каталитическую активность МДГ 3 из *Rh. steppense*: I – Mg^{2+} ; II – Mn^{2+} ; 1 – 0.05 мМ ОА; 2 – 0.1 мМ ОА.

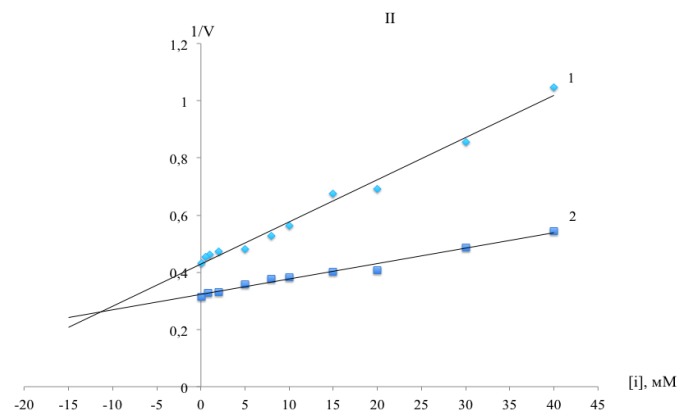
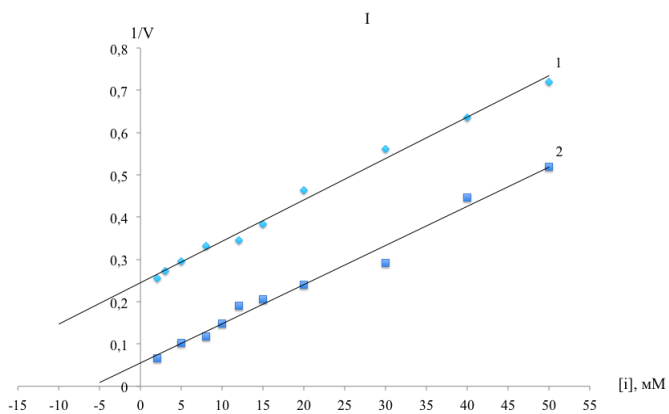


Рис. 35. Графическое представление ингибирующего действия катионов металлов на каталитическую активность МДГ 1 из *Rh. steppense*: I – Ca^{2+} ; II – Ba^{2+} ; 1 – 0.05 мМ ОА; 2 – 0.1 мМ ОА.

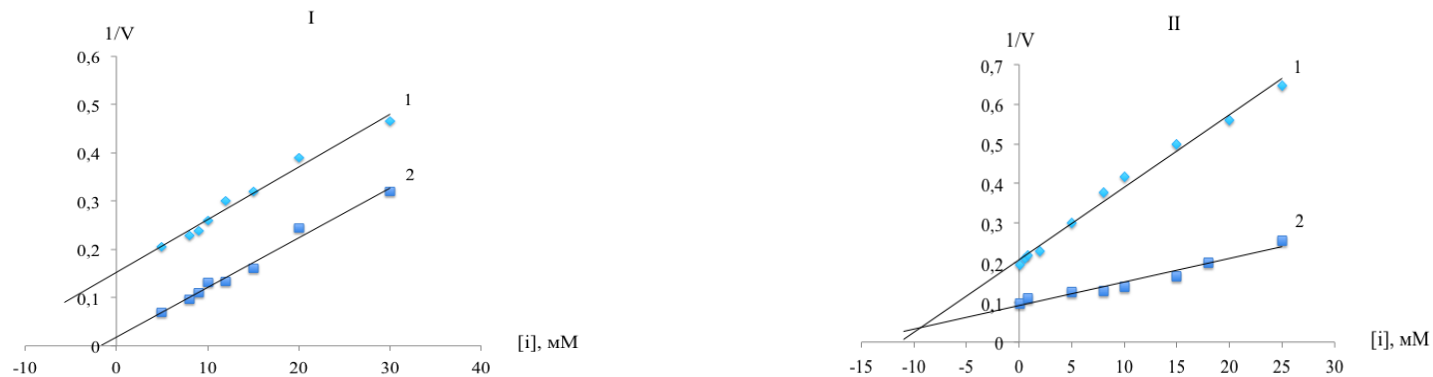


Рис. 36. Графическое представление ингибирующего действия катионов металлов на каталитическую активность МДГ 2 из *Rh. steppense*: I – Ca²⁺; II – Ba²⁺; 1 – 0.05 мМ ОА; 2 – 0.1 мМ ОА.

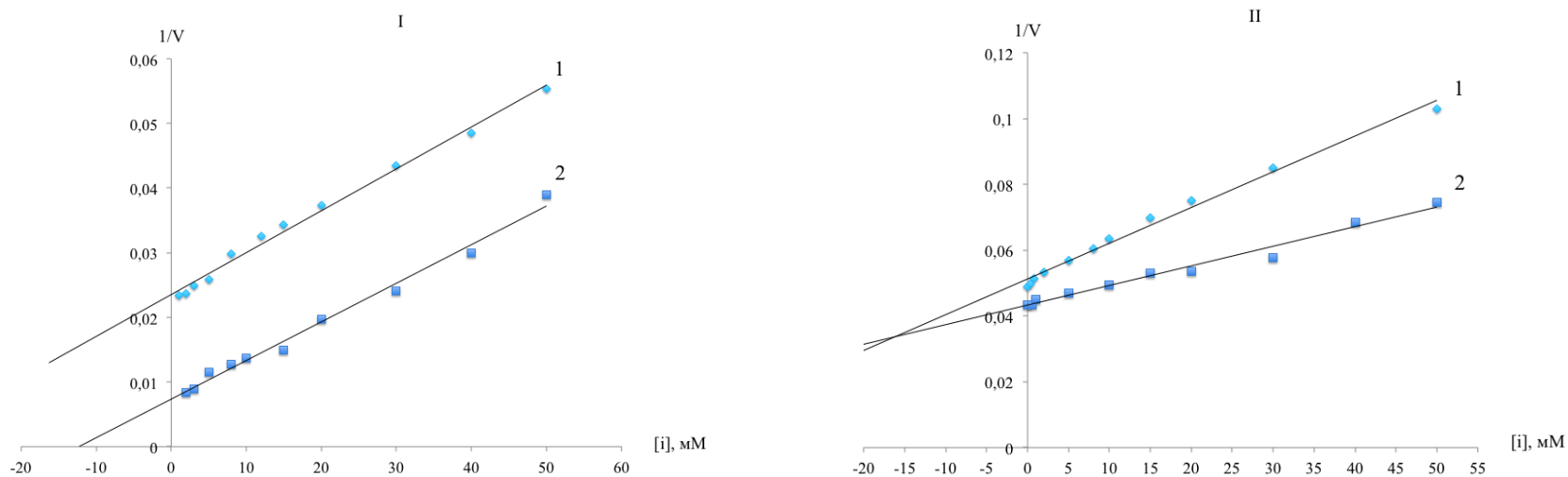


Рис. 37. Графическое представление ингибирующего действия катионов металлов на каталитическую активность МДГ 3 из *Rh. steppense*: I – Ca²⁺; II – Ba²⁺; 1 – 0.05 мМ ОА; 2 – 0.1 мМ ОА.

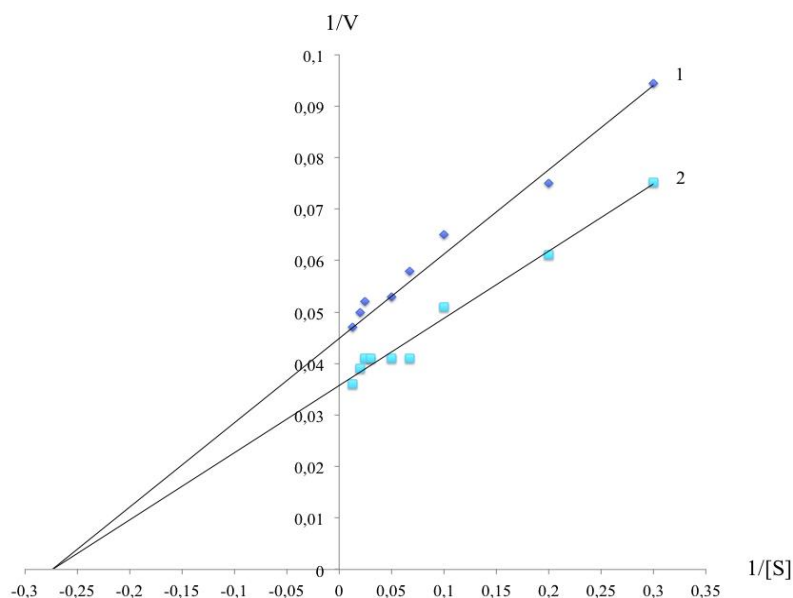


Рис. 38. Графическое представление активирующего влияния катионов калия на каталитическую активность МДГ 1 из *Rh. steppense*: 1 – 0.05 мМ ОА; 2 – 0.1 мМ ОА.

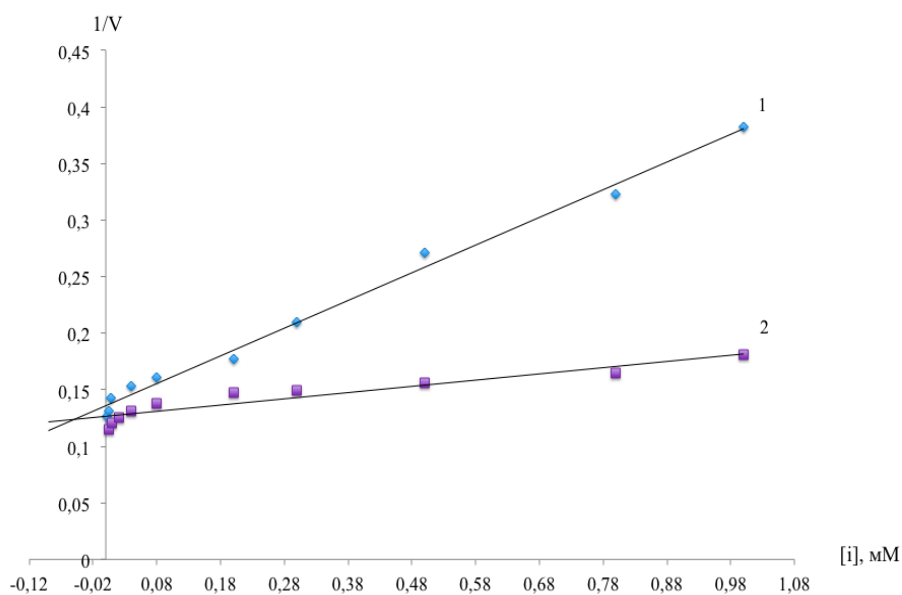


Рис. 39. Расчет значения величины K_i (цитрат) для МДГ 1 из *Rh. steppense*: 1 – 0.05 мМ ОА; 2 – 0.1 мМ ОА.

Такие органические кислоты, как изоцитрат, сукцинат и фумарат в концентрациях от 0.001 до 5 мМ не оказывали влияния на активность

молекулярных форм МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 из исследуемых микроорганизмов.

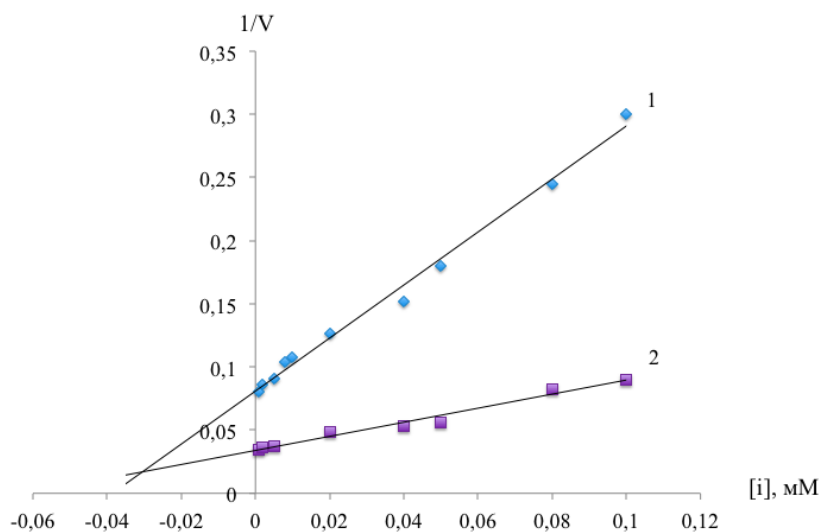


Рис. 40. Расчет значения величины K_i (цитрат) для МДГ 2 из *Rh. steppense*: 1 – 0.05 mM OA; 2 – 0.1 mM OA.

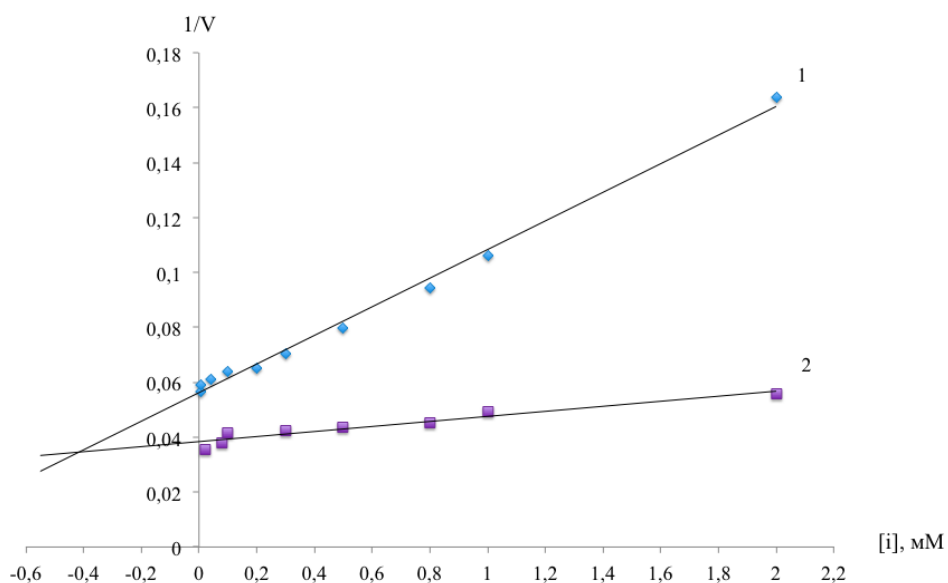


Рис. 41. Расчет значения величины K_i (цитрат) для МДГ 3 из *Rh. steppense*: 1 – 0.05 mM OA; 2 – 0.1 mM OA.

Таким образом, выделенные изоформы МДГ проявляют различную степень устойчивости к действию цитрата (и другие отличия по

каталитическим и регуляторным характеристикам), что может иметь важное значение для их функциональной роли в процессах трансформации клеточного метаболизма *Rh. steppense* при аэробном хемотрофном типе культивирования. Тетрамерная МДГ 2, характеризующаяся самым низким значением K_i по ОА, а также наиболее подверженная регуляторному влиянию цитрата, – принимает участие в анаболических процессах и обеспечивает протекание реакций ЦТК.

При возникновении в клетке условий избытка макроэргических соединений может наблюдаться конкурентное ингибирование активности ферментов малатдегидрогеназной системы определенными карбоновыми кислотами и торможение работы цикла Кребса. Димерная форма МДГ 3, проявляющая максимальную устойчивость к цитрату, играет важную роль при выходе на конструктивный метаболизм, обеспечивая функционирование ГЦ, индуцируемого у *Rh. steppense* при хемотрофном росте в присутствии кислорода.

2.2.4.6. Определение температурного оптимума для изоформ МДГ

При повышении или понижении температуры окружающей среды в белковой молекуле наблюдаются определенные изменения межатомных взаимодействий, что, в свою очередь, отражается на различных формах связей и оказывает влияние на протекание клеточных реакций. В результате такого регуляторного воздействия может изменяться эффективность белков как катализаторов, а также изоэнзимный состав клетки.

Для трех изоформ исследуемой ферментной системы были установлены температурные оптимумы (интервал температур от 0 до 80°C), составившие при восстановлении ОА: 45°C (МДГ 1), 55°C (МДГ 2) и 50°C (МДГ 3); при окислении малата: 40°C – для МДГ 1 и 2 и 45°C – для МДГ 3 (рис. 42–44).

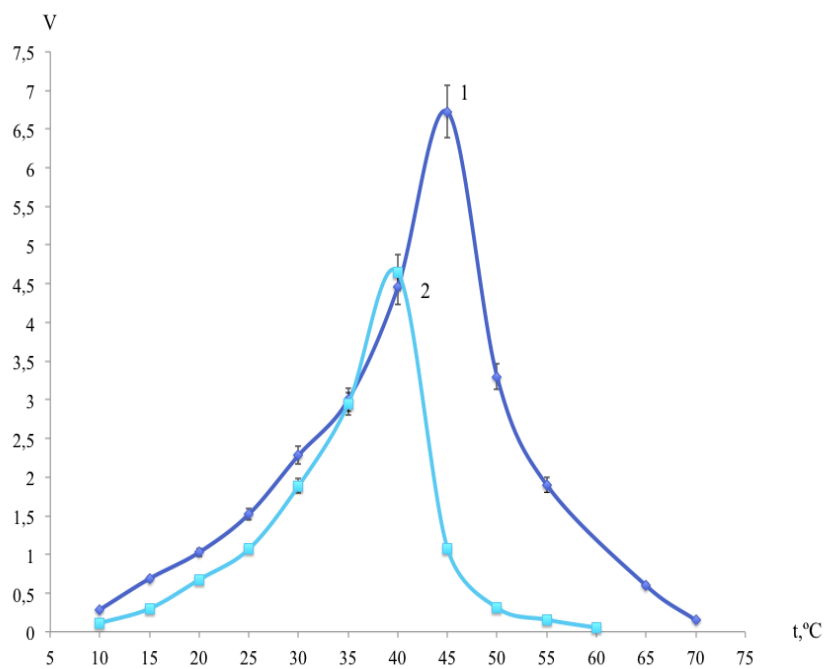


Рис. 42. Графическое представление зависимости активности МДГ 1 от температуры: 1 – обратная реакция; 2 – прямая реакция.

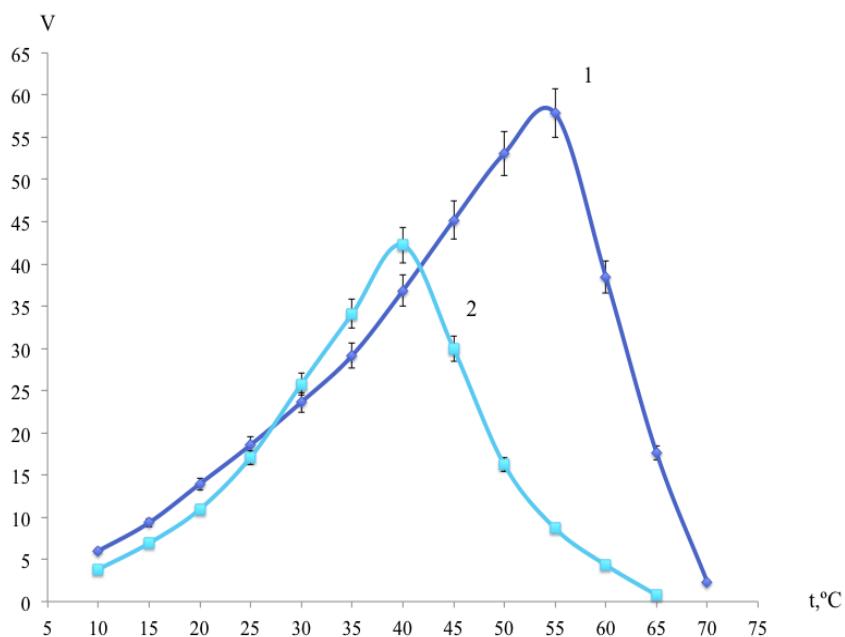


Рис. 43. Графическое представление зависимости активности МДГ 2 от температуры: 1 – обратная реакция; 2 – прямая реакция.

Сходные значения температурных оптимумов сообщаются для МДГ из других мезофильных микроорганизмов [91, 100, 158, 159, 184].

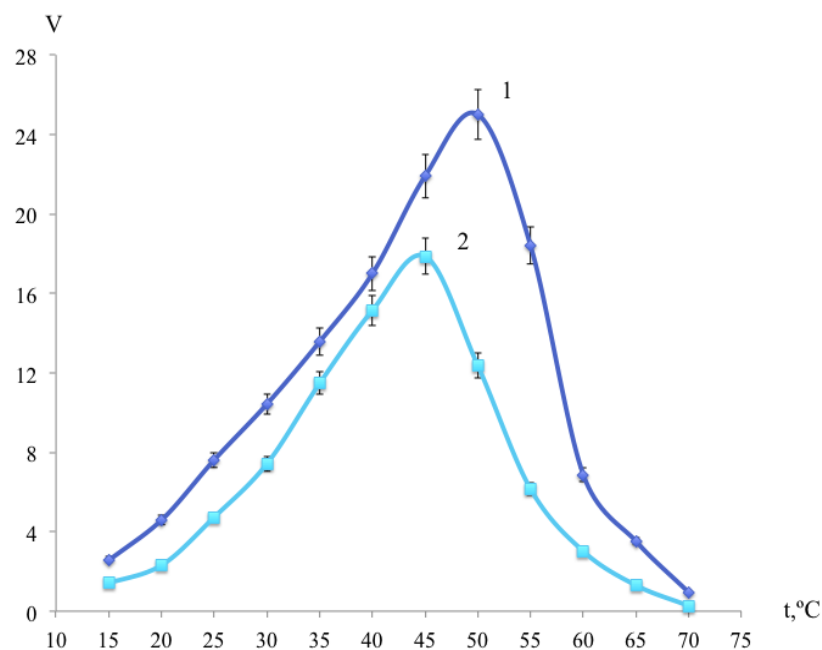


Рис. 44. Графическое представление зависимости активности МДГ 3 от температуры: 1 – обратная реакция; 2 – прямая реакция.

2.2.4.7. Исследование и анализ термостабильности малатдегидрогеназы

Проведено исследование термостабильности трех изоформ МДГ из галоалкалофильных бактерий *Rh. steppense*, культивируемых в стрессовых хемотрофных условиях. Фермент инкубировали при различных значениях температуры и измеряли его активность за 1; 5; 10; 15 и 20 мин (рис. 45–47). Анализ полученной зависимости активности МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 от времени инкубации позволил выявить интервал температур, в пределах которого олигомерные формы энзима оставались стабильными: 0–50°C. Характерной особенностью функционирования малатдегидрогеназной системы явилось резкое снижение каталитической активности при 70°C.

Установлено, что наиболее термостабильной является тетрамерная форма МДГ 2: после третьей минуты инкубации при 50°C наблюдалось незначительное снижение ферментативной активности, после пяти минут – на 25%, а после 20 – на 48%. Резкое падение активности зафиксировано при

70°C – после 5 мин инкубации фермент практически полностью инактивировался.

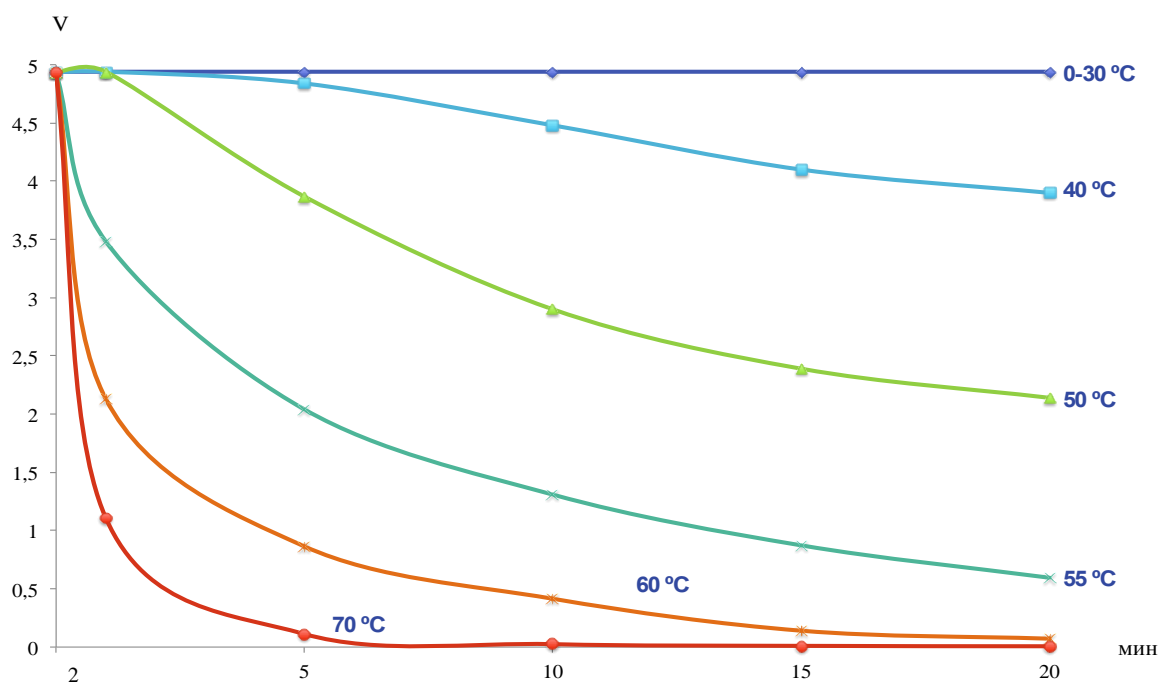


Рис. 45. Графическое представление зависимости активности изоформы МДГ 1 от времени инкубации в интервале температур 0–70°C.

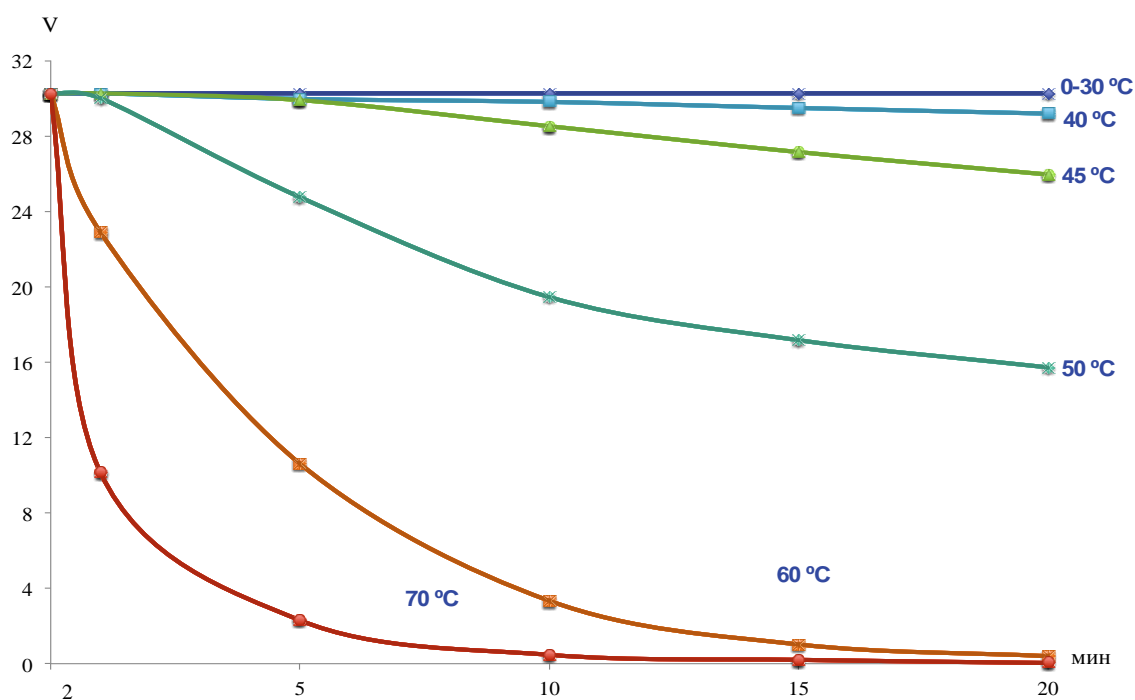


Рис. 46. Графическое представление зависимости активности изоформы МДГ 2 от времени инкубации в интервале температур 0–70°C.

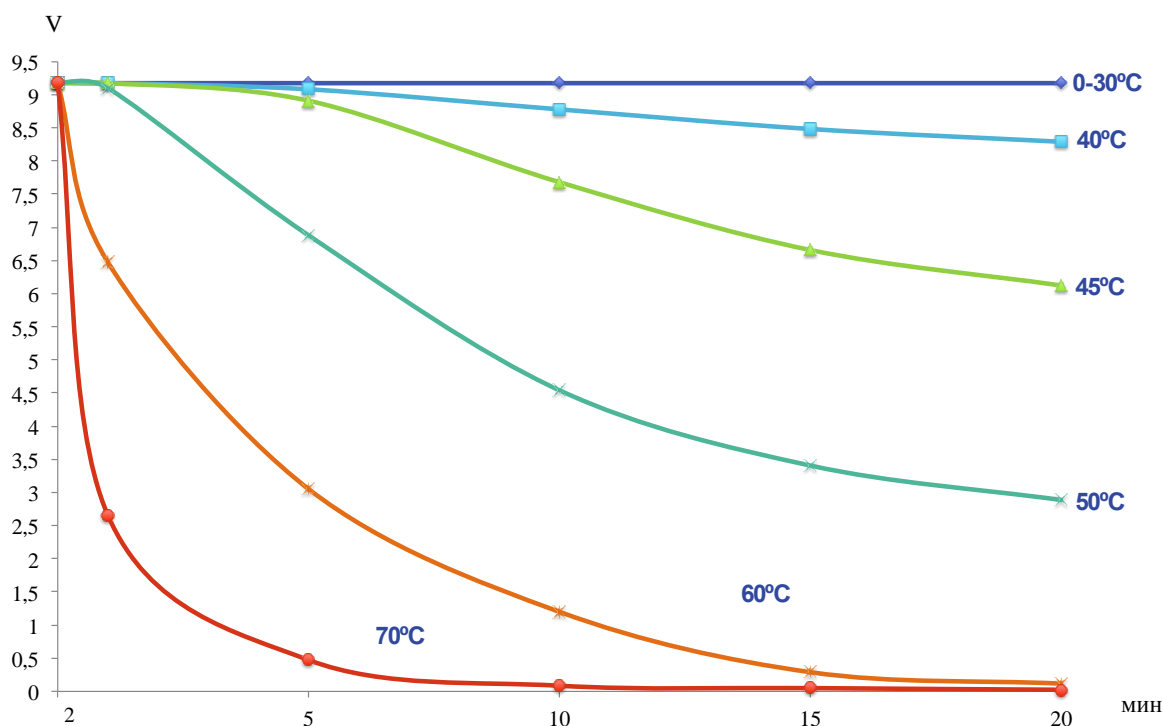


Рис. 47. Графическое представление зависимости активности изоформы МДГ 3 от времени инкубации в интервале температур 0–70°C.

Аналогичные зависимости снижения активности фермента при повышении температуры показаны и для многих других прокариотических организмов [91, 100, 158, 159].

2.2.5. Функционирование МДГ из *Rh. steppense* при индукции глиоксилатного цикла

Малатдегидрогеназная система пурпурных бактерий *Rh. steppense* при осуществлении адаптивной реакции к хемотрофному типу питания в аэробных условиях способна изменять свой изоферментный состав, что сопровождается индукцией октамерной, тетрамерной и димерной форм энзима. При этом каждая изоформа МДГ характеризуется специфическим участием в ферментативном механизме трансформации метаболических потоков у объекта исследования.

2.2.5.1. Индукция активности изоцитратлиазы при хемотрофном типе культивирования бактерий

Для фототрофных пурпурных бактерий характерно переключение метаболизма с фотосинтеза на дыхание и обратно в зависимости от присутствия в среде света или O_2 . Однако в качестве основного процесса, полностью обеспечивающего бактериальную клетку энергией, выступает фотосинтез, и анаэробные условия представляются оптимальными для роста [110].

Установлено, что конститутивная тетрамерная форма МДГ из культивируемых фототрофно *Rh. steppense* принимает участие в энергетических реакциях ЦТК, занимающих подчиненное положение при протекании фотосинтеза.

В стрессовых аэробных условиях роста исследуемых микроорганизмов в темноте наблюдается индукция активности изоцитратлиазы (ИЦЛ), что свидетельствует о функционировании глиоксилатного цикла, выполняющего конструктивную роль в клетке (рис. 48). При данном типе питания у *Rh. steppense* выявлено появление димерной изоформы МДГ 3, которая принимает участие в обеспечении работы ГЦ.

Проведение анализа с использованием итаконата (ингибитора глиоксилатного цикла) позволило продемонстрировать исчезновение полосы МДГ 3 в ПААГ и доказать ее специфическую роль в функционировании ГЦ (рис. 49).

2.2.5.2. Динамика активности изоцитратлиазы

Результаты исследования динамики активности изоцитратлиазы при аэробном хемотрофном культивировании *Rh. steppense* представлены в табл. 4. У бактерий, осуществляющих фототрофный тип роста, активности ИЦЛ обнаружено не было.

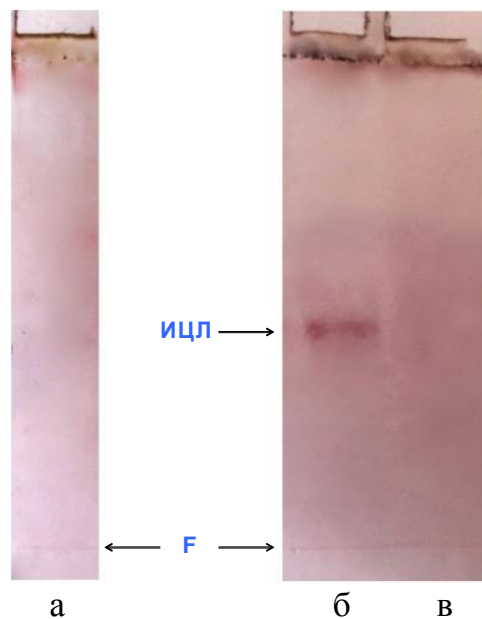


Рис. 48. Электрофоретический анализ активности ИЦЛ из *Rh. steppense*: а – фототрофный тип роста; б – хемотрофный тип роста; в – хемотрофный тип роста в присутствии итаконата.

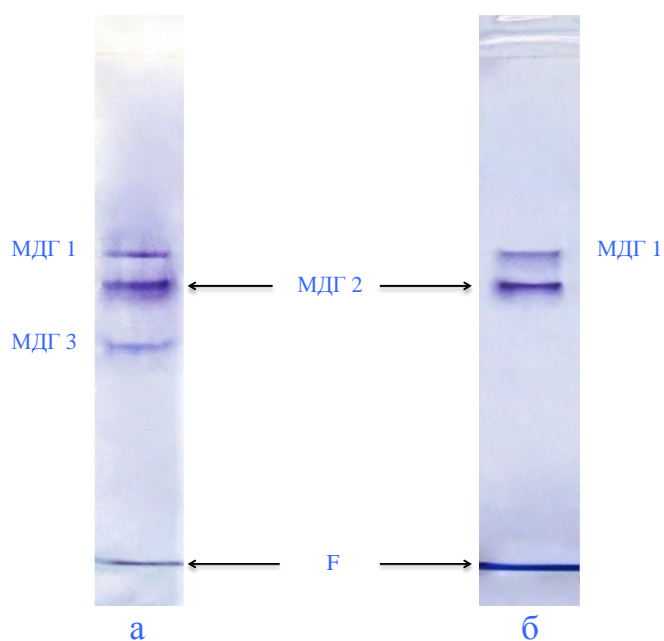


Рис. 49. Электрофоретический анализ малатдегидрогеназной системы из *Rh. steppense*: а – аэробный хемотрофный рост; б – аэробный хемотрофный рост в присутствии итаконата; F – фронт бромфенолового синего.

Динамика активности изоцитратлиазы из *Rh. steppense* ($n = 3$, $p \leq 0.05$)

Дни культивирования	Общая активность ИЦЛ	Содержание белка, мг	Удельная активность ИЦЛ, Е/мг
1	0,18	2,15	0,08
2	2,10	3,48	0,60
3	2,20	4,10	0,54
4	2,23	2,95	0,76
5	2,56	4,16	0,62
6	2,52	3,63	0,69
7	2,37	3,85	0,62

Значительное увеличение удельной активности (УА) ИЦЛ наблюдается уже на второй день хемотрофного культивирования *Rh. steppense*. На 4 день величина УА достигает максимального значения – 0.76 Е/мг белка, и далее выходит на плато (рис. 50).

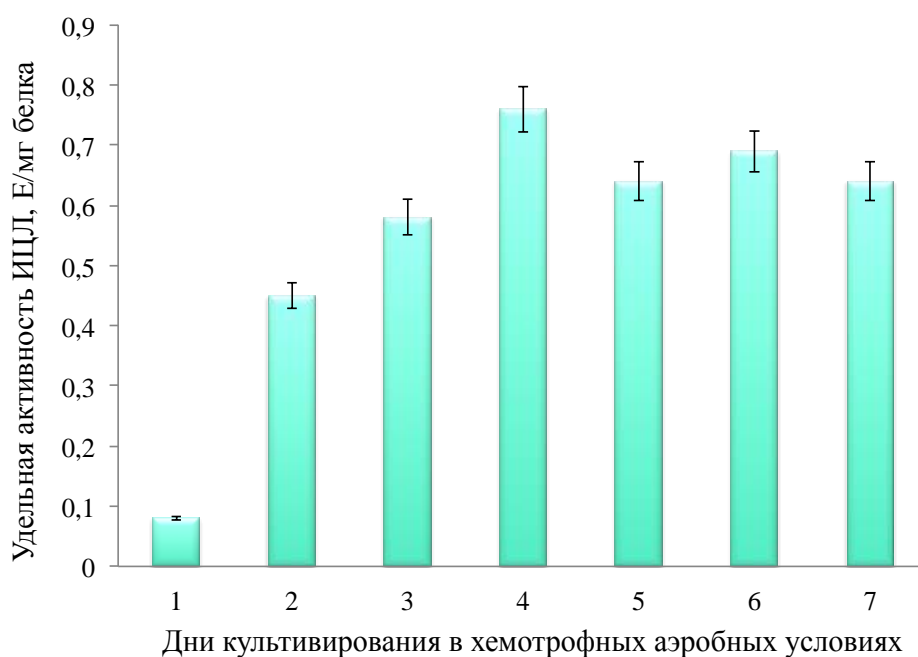


Рис. 50. Результаты исследования динамики активности изоцитратлиазы при аэробном типе культивирования *Rh. steppense* в темноте.

2.2.6. Функционирование МДГ из *Rh. steppense* в условиях оксидативного стресса

При хемотрофном типе культивирования *Rh. steppense* в присутствии O₂ наблюдается существенное увеличение активности антиоксидантных ферментов (СОД и каталазы) и происходит переключение реакций цикла Кребса на выполнение энергетических функций, а не участия в конструктивном метаболизме при доминировании фотосинтетических процессов.

В оптимальных условиях анаэробного фототрофного роста у исследуемых бактерий зафиксировано довольно низкое значение УА каталазы по сравнению с величиной данного показателя при культивировании *Rh. steppense* в стрессовых аэробных условиях (табл. 5).

Таблица 5.

Динамика активности каталазы из бактерий *Rh. steppense* при аэробном типе культивирования в темноте (n = 3, p ≤ 0.05)

Тип культивирования	Микро-аэробно на свету	Аэробно в темноте, дни						
		1	2	3	4	5	6	7
Удельная активность каталазы, Е/мг	0.015	0.23	0.28	0.32	0.45	0.41	0.39	0.37

Максимального значения удельная активность каталазы достигает на четвертый день хемотрофного культивирования *Rh. steppense* (0.45 Е/мг белка) (рис. 51).

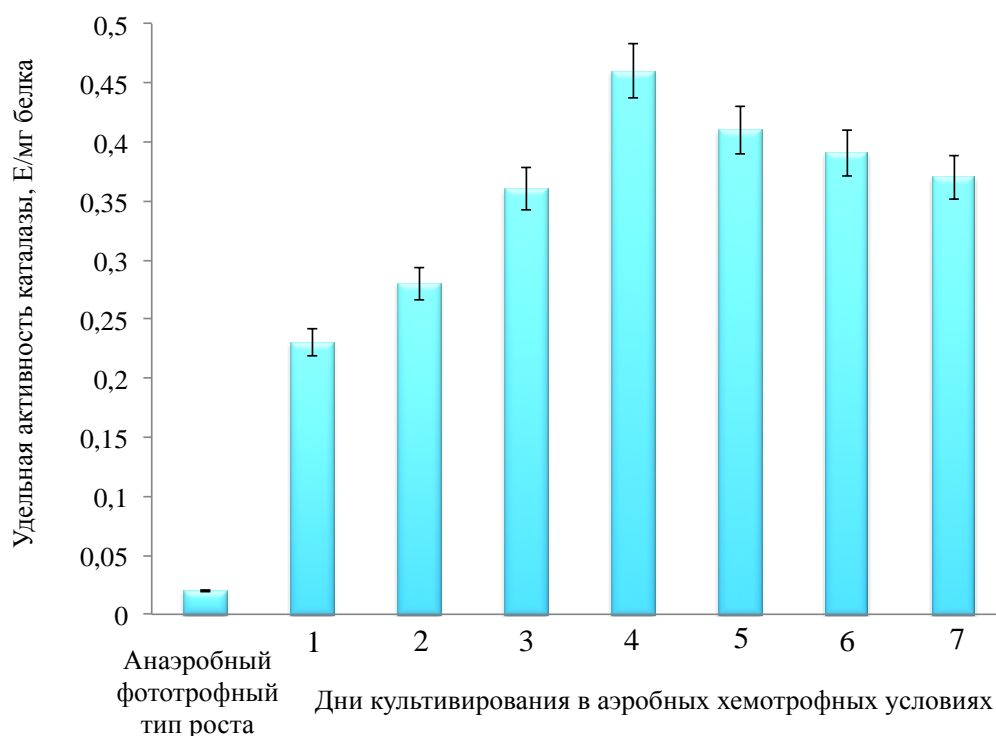


Рис. 51. На диаграмме представлены результаты исследования динамики активности каталазы при аэробном типе культивирования микроорганизмов *Rh. steppense* A-20s в темноте.

Удельная активность еще одного фермента оксидативного стресса – супероксиддисмутазы – при разных типах культивирования *Rh. steppense*, составила: в анаэробных фототрофных условиях – 0.52 усл. ед/мг белка; в аэробных условиях роста бактерий в темноте – 5.73 усл. ед/мг белка (рис. 52).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии окислительного стресса, приводящего к переключению метаболических потоков у исследуемых микроорганизмов.

С помощью электрофоретического исследования ферментной системы установлена роль изоформы МДГ 1 в адаптации к аэробным условиям роста *Rh. steppense*. На рис. 53 продемонстрировано исчезновение полосы МДГ 1 в ПААГ при хемотрофном культивировании бактерий, но в бескислородных условиях.

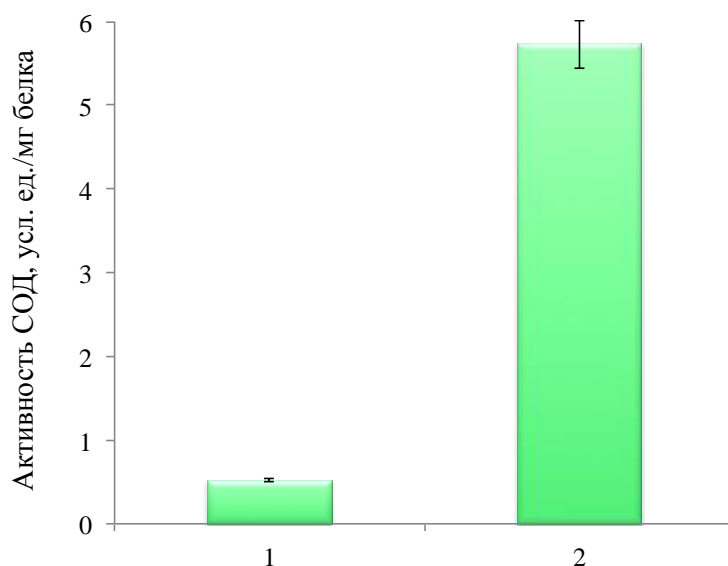


Рис. 52. Удельная активности СОД из бактерий *Rh. steppense* при разных типах культивирования: 1 – фототрофный рост в анаэробных условиях; б – хемотрофный рост в присутствии O₂.

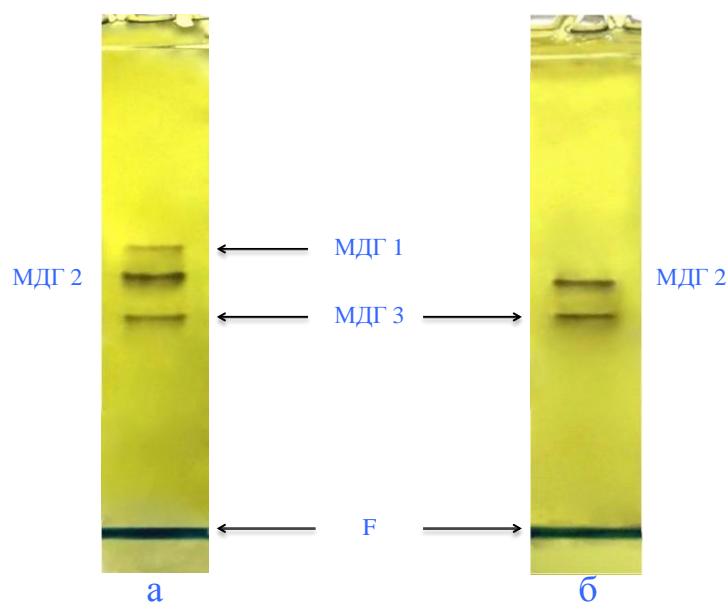


Рис. 53. Электрофоретический анализ малатдегидрогеназной системы из *Rh. steppense*: а – хемотрофный рост в присутствии O₂; б – хемотрофный рост в бескислородных условиях; F – фронт красителя.

Анализ полученных данных позволяет предположить, что октамерная форма МДГ 1 может играть определенную роль в адаптации *Rh. steppense* к

существованию в условиях оксидативного стресса и участвует в процессах синтеза ОА, выполняющего функцию антиоксиданта, осмолитов, азотном обмене, глюконеогенезе. МДГ 2 обеспечивает функционирование ЦТК, а МДГ 3 - глиоксилатного цикла с выходом на конструктивный метаболизм.

2.2.7. Молекулярные-биологические исследования

2.2.7.1. Выделение ДНК и экстракция суммарной клеточной РНК

Для комплексного изучения особенностей адаптации малатдегидрогеназной ферментной системы при смене типа питания и условий культивирования бактерий *Rh. steppense* A-20s^T проведены молекулярно-биологические исследования.

На первом этапе было осуществлено выделение геномной ДНК без следов деградации и суммарной клеточной РНК из исследуемых галоалкалофильных микроорганизмов.

Для анализа и оценки экстрагированной РНК проводили электрофорез в 1% геле агарозы с последующей визуализацией результатов, что позволило продемонстрировать высокое качество полученных препаратов, одним из критериев которого является преобладание 23S рРНК над 16S (рис. 54).

2.2.7.2. Идентификация гена *mdh* у бактерий *Rh. steppense*

До настоящего времени аннотирование генома фототрофных пурпурных несерных бактерий *Rhodovulum steppense* A-20s^T, устойчивых к высоким концентрациям солей, не проводилось. В связи с этим, вырожденные праймеры были разработаны на основе определенных участков последовательностей генов *mdh*, проявляющих высокую степень консервативности независимо от широко разнородных таксономических позиций анализируемых микроорганизмов.

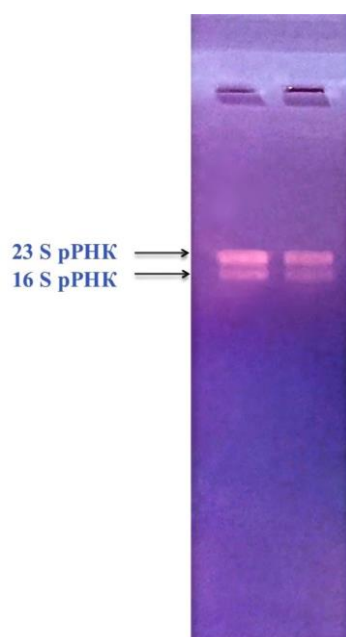


Рис. 54. Препараты суммарной РНК, выделенной из *Rh. steppense* А-20s^T в 1% геле агарозы.

При выявлении консервативных участков осуществляли выравнивание (AliBee Multiple Alignment, Primer-BLAST) нуклеотидных последовательностей *mdh* из *Rh. sphaeroides* 2.4.1. и бактерий различных таксономических групп (NCBI data base): *Rh. rubrum* ATCC, *Rhodococcus erythropolis* PR4, *Rhodococcus jostii* RHA1, *Rhodopirellula baltica* SH1, *Sphingomonas sp.* NX-3, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *E. coli* O157:H7 str. Sakai, *Thermus thermophilus* HB8, *Haemophilus influenzae* Rd KW20, *Vibrio cholerae* O1 biovar, *Coxiella burnetii* RSA, *Streptomyces coelicolor*, *Anaplasma marginale* str. Florida, *Rickettsia conorii* str. Malish, *Arcobacter butzleri* RM4018, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Caulobacter crescentus*, *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, *Ketogulonigenium vulgare*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus megaterium* DSM319, *Salinispora pacifica*, *Halomonas boliviensis*, *Saccharomyces cerevisiae* S288c.

ПЦР-анализ с использованием в качестве матрицы геномной ДНК и вырожденными праймерами для гена *mdh* позволил продемонстрировать

наличие единственной полосы в 1%-м геле агарозы, что подтверждает предположение о существовании только одного гена, кодирующего МДГ в геномной ДНК исследуемых бактерий.

Таким образом, МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 из *Rh. steppense*, полосы каталитической активности которых были обнаружены на электрофореграмме после специфического проявления (рис. 16), представляют собой изоформы, а их изоэлектрические пептидные компоненты определяются одним геном *mdh*.

Секвенирование очищенной нуклеотидной последовательности экстрагированного ПЦР-продукта было выполнено в лаборатории отдела ЗАО «Евроген» (Москва).

Результаты сравнения секвенированной последовательности ампликона *mdh* с генетической базой данных показали высокий процент сходства с соответствующими фрагментами последовательностей генов, ответственных за синтез МДГ из других микроорганизмов.

Например, идентичность последовательности с участком гена из *Rh. sphaeroides* 2.4.1 (CP000143.2) составляет 85%, из *Rh. palustris* BisB181 (CP000301.1) – 82%, а из *Rh. sulfidophilum* DSM 1374 (CP015418.1) – 91% (рис. 55).

На основе сиквенса ампликона гена *mdh* осуществляли подбор и синтез специфической последовательности олигонуклеотидов (Primer-BLAST):

прямой, 5'-GCTTGACGCGATGGTTTGGG-3';

обратный, 5'-AGCCCATGTCCACCAGATCG-3'.

2.2.7.3. Амплификация комплиментарной ДНК

Набор комплиментарных ДНК был получен методом обратной транскрипции с использованием выделенных препаратов суммарной клеточной РНК из *Rh. steppense*. Последующий ПЦР-анализ с использованием в качестве матрицы кДНК и специфическими праймерами

для *mdh* позволил выявить присутствие продукта исследуемого гена и сделать вывод о его экспрессии. Единственная полоса в 1%-м геле агарозы служит подтверждением специфического связывания праймеров с кДНК.

```

Rh.palustris      CCGCTCGACGCCATGGTCTGGGCGCTGCAGAAAGCCTCCGGGCTGCCGCACCG-CAAGGT
Rh.sphaeroides   CCGCTCGACGCGATGGTCTGGGCGCTGCAGCAATTTCTCGGGCCTG-CCGGCCGAGAAGGT
Seq              CCGCTCGACGCGATGGTCTGGGCGCTGCAGCAATTTCTCGGGCCTG-CCGGCCGAGAAGGT
Rh.sp.MB263      CCGCTCGACGCGATGGTCTGGGCGCTGCAGCAATTTCTCGGGCCTT-CCGGCCGAGAAGGT
Rh.sulfidophilum CCGCTCGACGCGATGGTCTGGGCGCTGCAGCAATTTCTCGGGCCTT-CCGGCCGAGAAGGT
*****
Rh.palustris      GGTCCGGCATGGCCGGCGTGCTCGACTCCGCCCGGTTCCGCTATTTTCT-GGCCGACGAAT
Rh.sphaeroides   GGTGGGCATGGCCGGCGTGCTCGACTCCGCCCGGTTCCGCTATTTTCT-GGCCGACGAAT
Seq              CGTGGGCATGGCCGGCGTTCTGGACAGCGCGCGCTTCCGCCATTTCTC-AGCCTGGAAT
Rh.sp.MB263      CGTCCGGCATGGCCGGCGTTCTGGACAGCGCGCGCTTCCGCCATTTCTC-AGCCTGGAAT
Rh.sulfidophilum CGTCCGGCATGGCCGGCGTGCTGGACAGCGCGCGCTTCCGCCATTTCTC-AGCCTGGAAT
** *****
Rh.palustris      TCAACGTCCTCGGTGGAAGACGTCACCGCTTTCGTGCTGGGCGGCCATGGCGACACCATGG
Rh.sphaeroides   TCAACGTCCTCGATGCGCGACGTGACGCGCTTCGTTCTGGGCGGCCATGGCGACACCATGG
Seq              TCAACGTCACGATGAAGGACGTCACCGCTTTCGTGCTGGGCGGCCATGGCGACACCATGG
Rh.sp.MB263      TCAATGTCCTCGATGAAGGACGTCACCGCTTTCGTGCTGGGCGGCCATGGCGACACCATGG
Rh.sulfidophilum TCAATGTCCTCGATGAAGGACGTGACCGCTTTCGTGCTGGGCGGCCATGGCGACACCATGG
**** ** *
Rh.palustris      TGCCGCTGGTG-AAGTACTCCACCGTGGCCGGCATTCGCTGCCCGACCTGGTGAAGATG
Rh.sphaeroides   TGCCGCTCGTC-CGCTACTCGACGGTGGCCGGCATCCCGCTGCCCGATCTCGTGCAGATG
Seq              TGCCGCTGA-CGCGCTATTCCACCGTCCGCGGCATGCCGCTGCCCGATCTGGTGGACATG
Rh.sp.MB263      TGCCGCTGA-CCCCTATTCCACCGTCCGCGGCATCCCGCTTCCCGATCTGGTGCAGATG
Rh.sulfidophilum TGCCGCTGA-CCCCTATTCCACCGTCCGCGGCATCCCGCTTCCCGATCTGGTGCATATG
*****
Rh.palustris      GGCTGGACCTCGCAGGCCCGGCTCGACGAGATCGTGCAGCGCACCCGCAACGGCGGCGC
Rh.sphaeroides   GGCTGGACCACGCAGGAGAAGCTCGACCAGATCGTGCAGCGCACCCGTGACGGCGGCGC
Seq              GGCTGGACCACGCAGGAGAAGCTCGACCAGATCGTGCAGCGCACCCGCGACGGCGGCGC
Rh.sp.MB263      GGCTGGACCACCCAGGACAAGCTCGACGCCATCGTGCAGCGCACCCGTGACGGCGGCTGC
Rh.sulfidophilum GGCTGGACCACCCAGGACAAGCTCGACGCCATCGTGCAGCGCACCCGTGACGGCGGCGC
*****

```

Рис. 55. Нуклеотидные последовательности ампликона гена *mdh* из *Rh. steppense* A-20s^T (Seq) и соответствующих фрагментов *mdh* из *Rh. palustris*, *Rh. sphaeroides*, *Rh. species* MB263, *Rh. sulfidophilum* DSM 1374.

При сравнении полученного ПЦР-продукта исследуемого ампликона гена *mdh* с маркерами длин ДНК было установлено, что его длина соответствует теоретически рассчитанной и составляет порядка 300 п. н. (рис. 56).

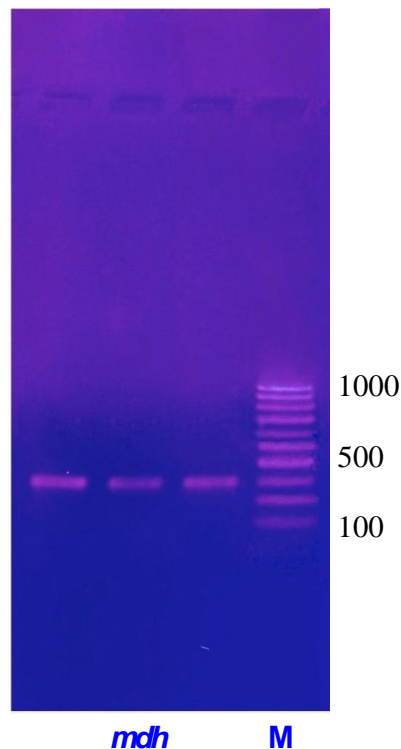


Рис. 56. Анализ амплифицированного ПЦР-продукта в 1%-м геле агарозы со специфичными праймерами для *mdh*: М – ДНК-маркеры.

2.2.7.4. Выявление особенностей экспрессии *mdh* из *Rh. steppense* в зависимости от условий культивирования

Для комплексного изучения особенностей адаптации малатдегидрогеназной ферментной системы в зависимости от типа питания и условий культивирования бактерий *Rh. steppense* (присутствия или отсутствия индуцибельных изоформ) было проведено исследование экспрессии гена, кодирующего фермент МДГ.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) позволила определить относительную концентрацию транскриптов *mdh* и выявить определенные изменения в интенсивности работы генетического аппарата при трансформации процессов бактериального метаболизма в условиях стресса (рис. 57).

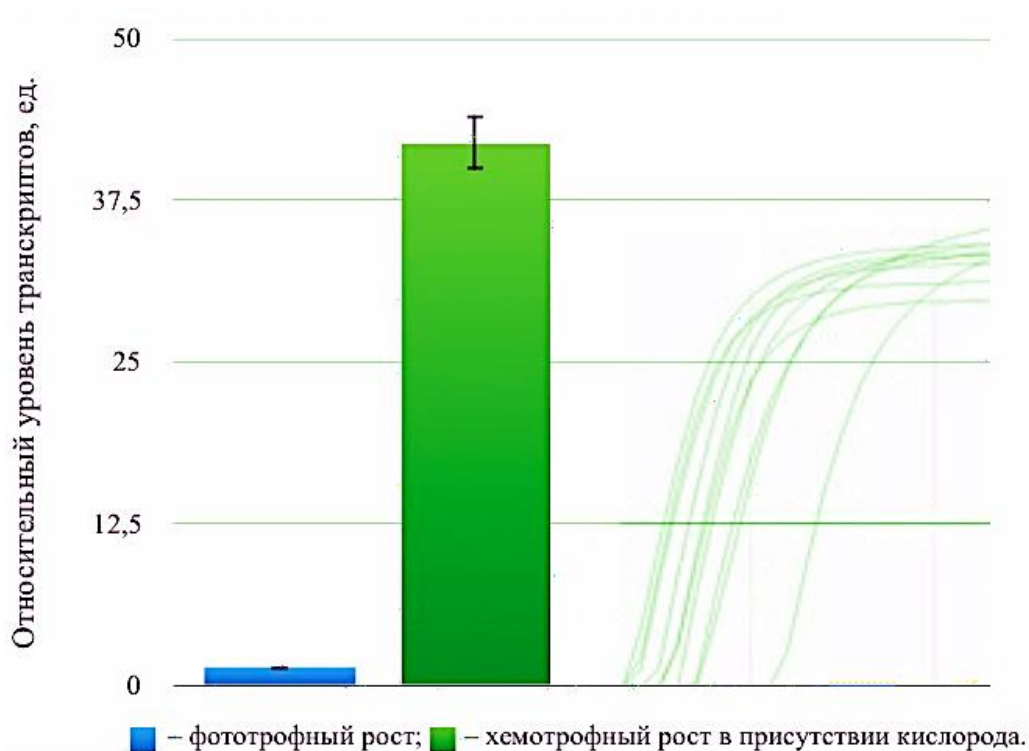


Рис. 57. Относительный уровень транскриптов гена *mdh* из *Rh. steppense* при разных типах культивирования: синим цветом выделен фототрофный рост в анаэробных условиях; зеленым – хемотрофный рост в присутствии O₂.

Сравнительный анализ относительного уровня транскриптов *mdh* при разных типах культивирования галоалкалофильных *Rh. steppense* показал, что в условиях хемотрофного аэробного роста (ферментная система из исследуемого объекта при данном типе культивирования представлена октамерной, тетрамерной и димерной изоформами) наблюдается многократное увеличение экспрессии гена по сравнению с уровнем экспрессии из данных бактерий, выращенных анаэробно на свету и характеризующихся единственной формой малатдегидрогеназы.

Данные, свидетельствующие об изменении скорости экспрессии гена *mdh* в зависимости от типа культивирования исследуемых микроорганизмов четко коррелируют с результатами измерений каталитической активности энзима. При выращивании бактерий в темноте в присутствии кислорода также наблюдается интересная особенность – резкое возрастание активности

малатдегидрогеназы (2.118 Е/мг белка) по сравнению с величиной удельной активности фермента ($УА = 0.457$ Е/мг) из *Rh. steppense*, культивируемых анаэробно на свету (рис. 58).

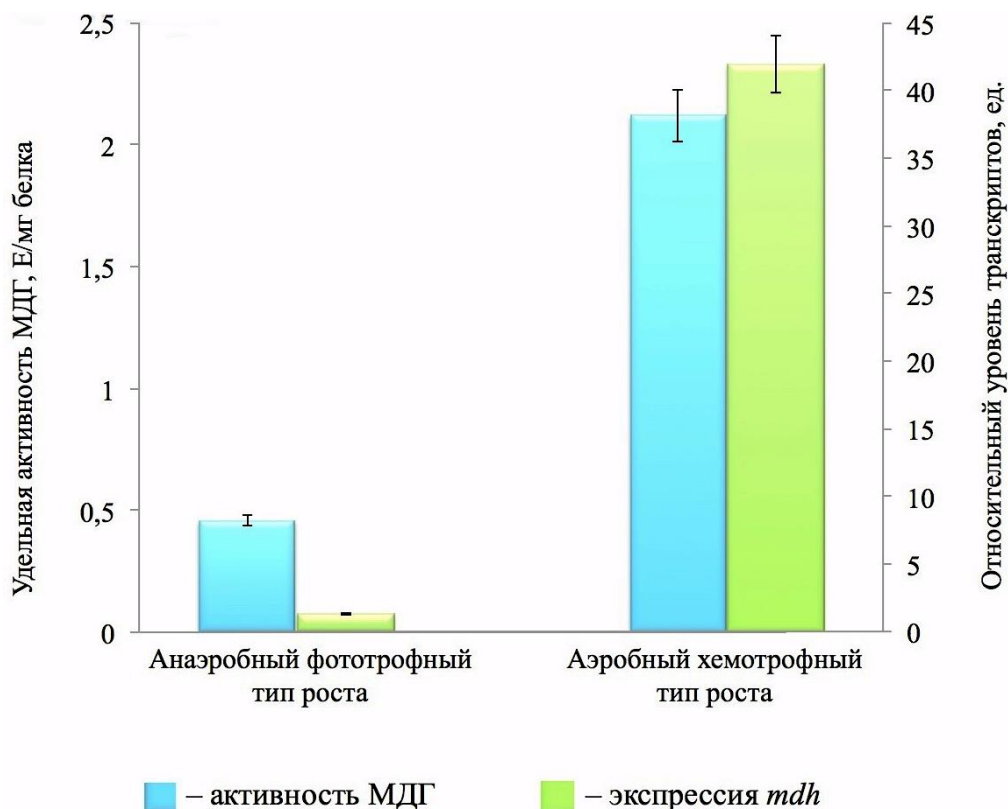


Рис. 58. Удельная активность и относительный уровень транскриптов гена *mdh* из *Rh. steppense* при разных типах культивирования.

Прямая зависимость УА МДГ от уровня экспрессии *mdh* свидетельствует о том, что повышение каталитической активности связано с увеличением концентрации мРНК гена, кодирующего исследуемый фермент, и синтезом дополнительных изоформ МДГ в условиях стресса.

2.2.7.5. Исследование динамики появления индуцибельных изоформ МДГ из *Rh. steppense*

При исследовании динамики появления индуцибельных изоформ малатдегидрогеназы методом аналитического электрофореза в нативном

ПААГ было установлено, что на второй день хемотрофного роста *Rh. steppense* в присутствии кислорода появляется изоформа МДГ 1 с электрофоретической подвижностью $R_f = 0.43$, а на четвертый день становится заметной МДГ 3 с $R_f = 0.67$. МДГ 2 является конститутивной тетрамерной формой фермента (рис. 59).

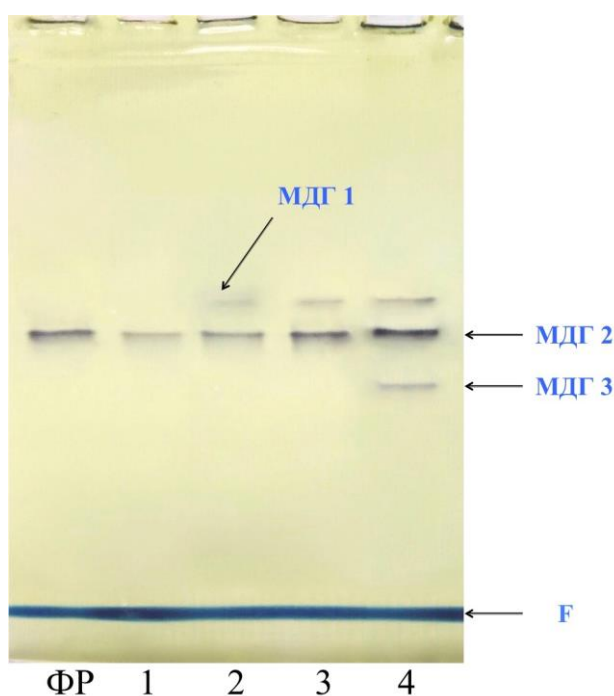


Рис. 59. Изменение изоферментного состава МДГ из *Rh. steppense*: ФР – фототрофный рост; 1-4 – дни культивирования бактерий в аэробных хемотрофных условиях; F – фронт бромфенолового синего.

С применением метода ПЦР-РВ продемонстрирована зависимость изменения содержания мРНК для гена, кодирующего МДГ, от времени культивирования микроорганизмов (рис. 60).

Результаты исследования показали, что в первый день хемотрофного типа культивирования у *Rh. steppense* не происходило существенного изменения экспрессии *mdh* по сравнению с данным показателем из бактерий в фототрофных условиях роста. Однако на второй и третий день

наблюдалось резкое увеличение относительной концентрации транскриптов гена *mdh*, которая составила 16.429 и 27.354 единицы соответственно.

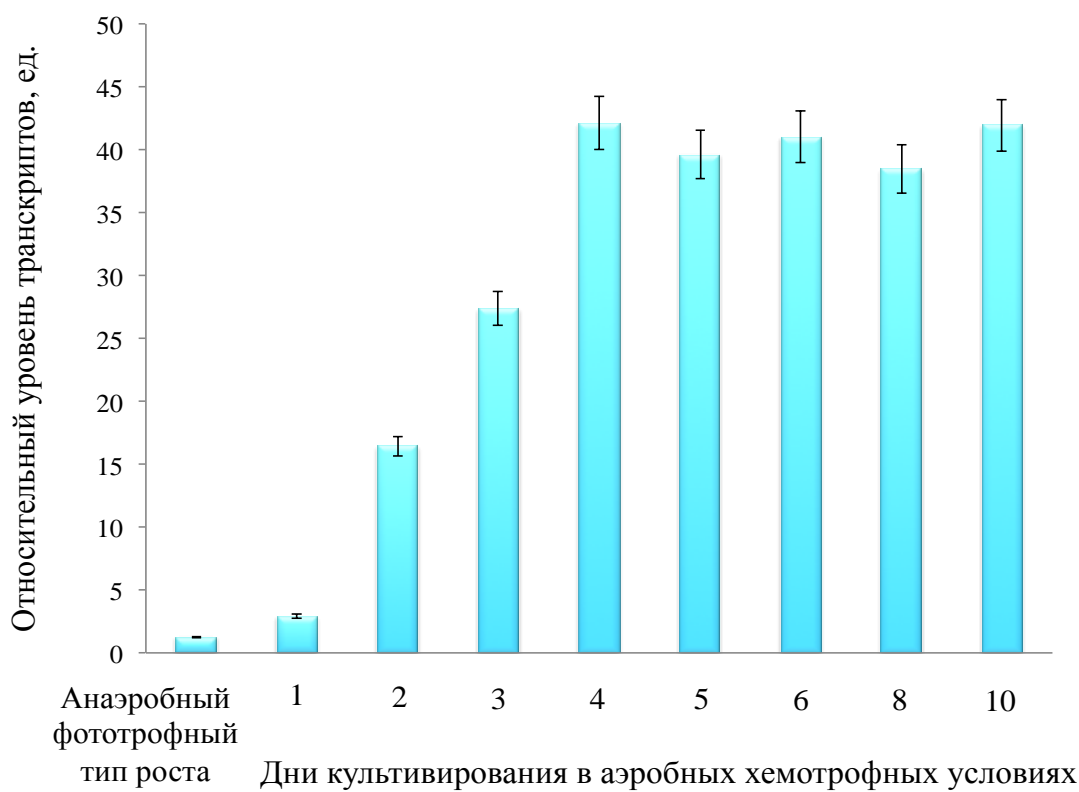


Рис. 60. Изменение относительного уровня транскриптов гена *mdh* при разных типах роста *Rh. steppense* и в зависимости от времени хемотрофного культивирования бактерий в присутствии O_2 .

Максимальное содержание мРНК для *mdh* было зафиксировано на четвертый день хемотрофного типа культивирования бактерий и составило 42.126 ед. Начиная с четвертого и далее до десятого дня (41.933) происходит выход уровня экспрессии на плато.

Увеличение относительной концентрации транскриптов гена *mdh* в зависимости от времени хемотрофного культивирования *Rh. steppense* коррелирует с исследованием динамики каталитической активности МДГ (рис. 61).

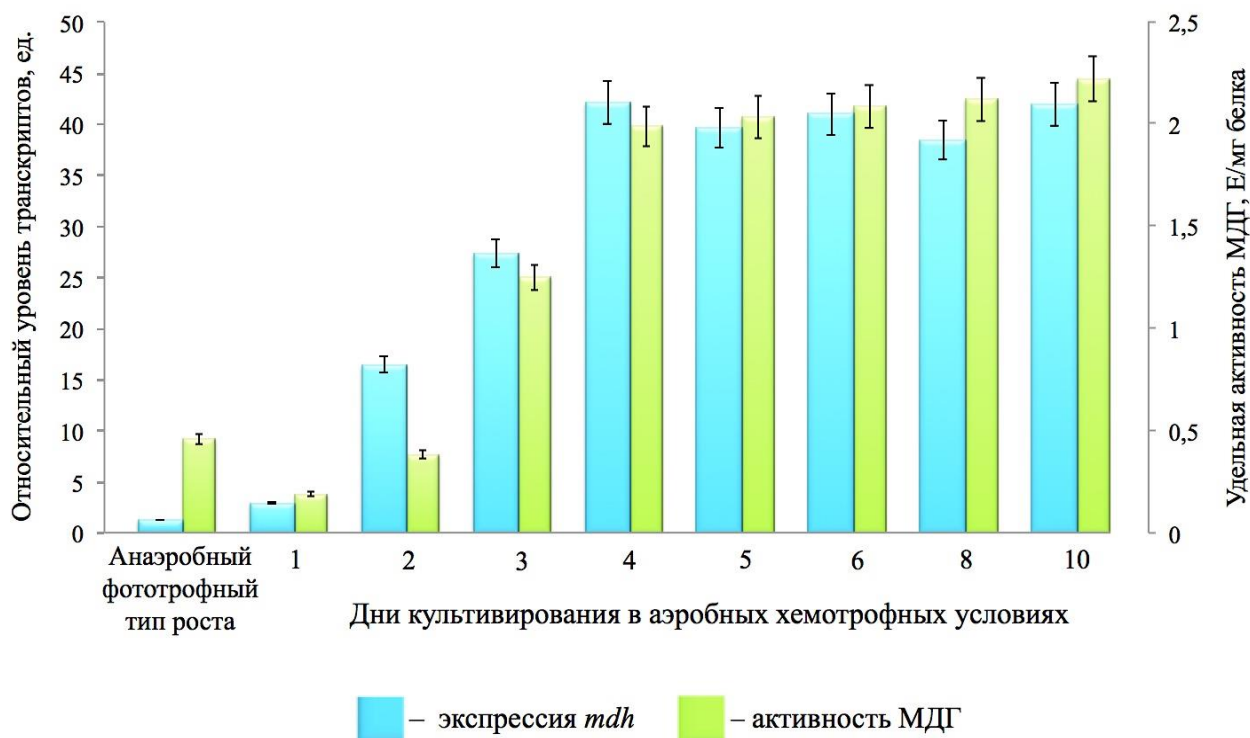


Рис. 61. Изменение относительного уровня транскриптов гена *mdh* и динамика активности МДГ при разных типах роста *Rh. steppense* и в зависимости от времени хемотрофного культивирования бактерий в присутствии O₂.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о структурно-функциональных изменениях малатдегидрогеназной ферментной системы из бактерий *Rh. steppense* штамм А-20s^T, исследуемые изоформы которой обеспечивают адекватное протекание как катаболических, так и анаболических процессов при смене типа питания и условий культивирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы была получена новая информация о трансформации процессов метаболизма несерных пурпурных бактерий *Rh. steppense* штамм А-20s^T. При переходе от анаэробного фототрофного к аэробному хемотрофному типу культивирования в клетках исследуемых микроорганизмов удалось зафиксировать определенные изменения ферментативного аппарата и на примере функционирования малатдегидрогеназной системы продемонстрировать механизмы биохимической адаптации бактерий к стрессовым воздействиям факторов среды.

Установлено, что у *Rh. steppense*, осуществляющих хемотрофный тип роста в присутствии кислорода, индуцируется биосинтез двух новых олигомерных форм фермента: октамерной МДГ 1 и димерной МДГ 3, имеющих важное значение при протекании адаптивной реакции клеточного метаболизма галоалкалофильных прокариот к существованию в условиях стресса. В представляющихся оптимальными анаэробных фототрофных условиях культивирования выявлено наличие всего одной конститутивной формы фермента – тетрамерной МДГ 2, принимающей участие в реакциях ЦТК, занимающих подчиненное положение при протекании фотосинтеза в качестве основного энергетического процесса.

В результате проведения специально разработанной 4-х стадийной очистки исследуемого фермента по модифицированной схеме были получены электрофоретически гомогенные препараты трех молекулярных форм малатдегидрогеназы при хемотрофном культивировании *Rh. steppense* в присутствии кислорода.

На гомогенных препаратах олигомерных изоформ фермента изучены и выявлены связанные с функциональной ролью определенные различия их каталитических и регуляторных характеристик.

Показано, что присутствие октамерной, тетрамерной и димерной МДГ, состоящих из идентичных субъединиц, но отличающихся величинами молекулярных масс нативных полипептидов, является важной структурной особенностью малатдегидрогеназной системы при хемотрофном типе культивирования *Rh. steppense* в условиях оксидативного стресса.

Впервые у исследуемых микроорганизмов была продемонстрирована индукция глиоксилатного цикла с выходом на конструктивный метаболизм. Применение ингибиторного анализа позволило доказать участие молекулярной формы МДГ 3 в функционировании ГЦ. Также в хемотрофных условиях роста галоалкалофильных бактерий зафиксировано значительное повышение активности ферментов супероксиддисмутазы и каталазы, что может свидетельствовать о наличии окислительного стресса, приводящего к переключению метаболических потоков и использованию других источников энергии у *Rh. steppense*. С помощью электрофоретического исследования ферментной системы установлена роль октамерной МДГ 1 в адаптации микроорганизмов к условиям оксидативного стресса при хемотрофном культивировании.

Проведенные молекулярно-биологические исследования позволили выявить характер генетической детерминации и природу множественных форм малатдегидрогеназы. Димерная, тетрамерная и октамерная МДГ кодируются единственным геном в геномной ДНК *Rh. steppense* и являются изоформами, образующимися в результате посттрансляционной модификации путем олигомеризации одинаковых субъединиц.

Кроме того, были продемонстрированы определенные изменения интенсивности работы гена, кодирующего исследуемый фермент. Повышение уровня экспрессии *mdh* является одним из механизмов переключения метаболических потоков бактериальной клетки при смене типа питания и условий культивирования *Rh. steppense*.

В оптимальных условиях анаэробного роста пурпурных бактерий на свету доминируют процессы, осуществляемые фотосинтетическим

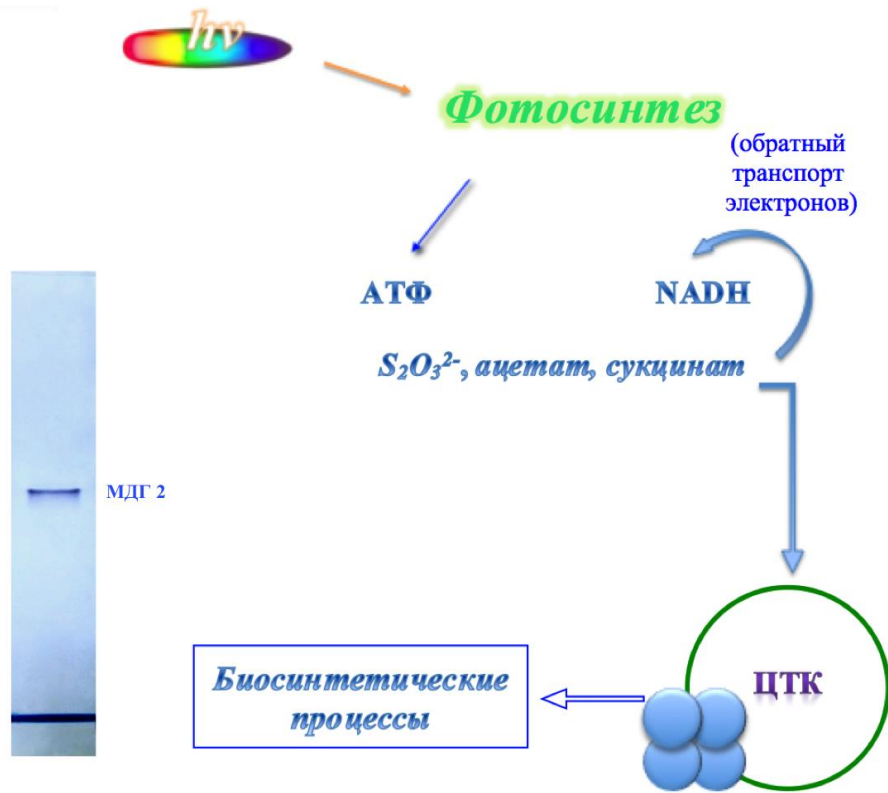
аппаратом, полностью обеспечивая клетку энергией, в связи с чем цикл Кребса выполняет конструктивную роль [92]. Концентрация мРНК МДГ в клетках микроорганизмов значительно ниже, чем при культивировании *Rh. steppense* аэробно в темноте, и малатдегидрогеназа представлена только одной конститутивной формой исследуемого энзима.

При переводе микроорганизмов в стрессовые условия, а именно: при отсутствии света и в присутствии кислорода, происходит активация ГЦ, переключение ЦТК на осуществление энергетической функции в клетке, значительное повышение активности ферментов оксидативного стресса. Соответственно, наблюдается индукция экспрессии *mdh* (количество мРНК МДГ в клетке резко увеличивается) и биосинтез двух дополнительных олигомерных форм МДГ 1 и МДГ 3.

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что октамерная изоформа МДГ 1 может играть определенную роль в адаптации микроорганизмов к существованию в условиях окислительного стресса и участвует в процессах синтеза осмолитов, азотном обмене, глюконеогенезе. Тетрамерная МДГ 2 обеспечивает функционирование ЦТК, а димерная форма МДГ 3 – глиоксилатного цикла с выходом на конструктивный метаболизм (рис. 62).

Таким образом, на примере настоящего исследования малатдегидрогеназной системы были продемонстрированы механизмы биохимической адаптации, осуществляемые на уровне ферментных систем. Выявленные структурно-функциональные изменения молекулы белка представляют важное значение для его функционирования в стрессовых условиях и для адекватного протекания как катаболических, так и анаболических процессов при аэробном хемотрофном типе культивирования бактерий *Rh. steppense* штамм А-20s^T.

Анаэробный фототрофный тип роста



Аэробный хемотрофный тип роста

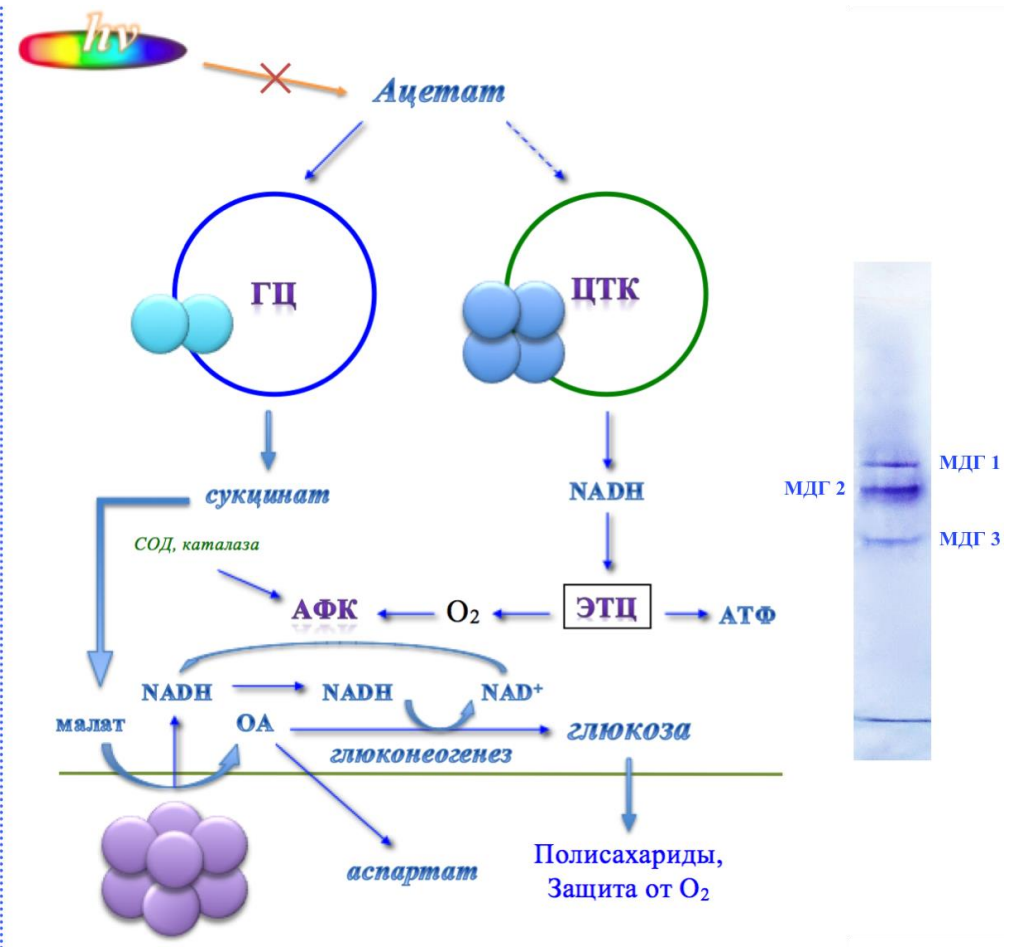


Рис. 62. Гипотетическая схема функционирования малатдегидрогеназной системы при разных типах культивирования бактерий *Rh. steppense*.

ВЫВОДЫ

1. Для переключения метаболических потоков у *Rh. steppense* при изменении типа питания (переход с фототрофного роста при анаэробнозе на хемотрофный в кислородных условиях) индуцируется образование двух новых олигомерных форм исследуемого фермента: МДГ 1 с $R_f = 0.43$ и МДГ 3 ($R_f = 0.67$), которые участвуют в осуществлении адаптивной реакции клеточного метаболизма бактерий к стрессовым условиям.
2. С помощью модифицированной схемы очистки из несерных пурпурных бактерий в условиях аэробного хемотрофного типа культивирования выделены и очищены электрофоретически гомогенные препараты трех изоформ МДГ с удельной активностью МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 – 6.253; 5.942; 6.990 Е/мг белка и степенью очистки в 65, 61 и 72 раза соответственно.
3. Методами денатурирующего электрофореза и масс-спектрометрического пептидного фингерпринт-анализа установлено, что димерная, тетрамерная и октамерная МДГ состоят из гомологичных субъединиц со значением $M_r = 35.06$ кДа. Были изучены и определены некоторые каталитические характеристики изоформ и регуляторные аспекты их функционирования, демонстрирующие определенные различия у исследуемых олигомеров (средство, степень устойчивости к субстратам и др.), обусловленные специфической функциональной ролью каждой из молекулярных форм фермента в адаптивной реакции клеточного метаболизма галоалкалофильных бактерий *Rh. steppense*.
4. Секвенирование ампликона гена *mdh* и использование полученной нуклеотидной последовательности позволило разработать и синтезировать специфические олигонуклеотидные праймеры. Проведен сравнительный анализ значений величин относительных уровней транскриптов гена, кодирующего исследуемый фермент из *Rh. steppense*

при разных типах культивирования и выявлены особенности экспрессии *mdh*.

5. Результаты исследований динамики активности маркерного фермента глиоксилатного цикла (ИЦЛ) в аэробных хемотрофных условиях роста микроорганизмов служат подтверждением индукции глиоксилатного цикла у галоалкалофильных *Rh. steppense*.
6. При изменении типа питания и культивировании представителей пурпурных бактерий рода *Rhodovulum* в присутствии O₂ зафиксировано значительное повышение активности СОД и каталазы, что может свидетельствовать о наличии явления окислительного стресса.
7. Индукция дополнительных изоформ фермента у *Rh. steppense* в условиях хемотрофного роста (появление октамерной формы на второй день и димерной – на четвертый день аэробного культивирования исследуемых микроорганизмов в темноте) коррелирует с возрастанием малатдегидрогеназной активности и увеличением содержания мРНК для гена *mdh*.
8. Определена функциональная значимость каждой из трех олигомерных форм МДГ и их специфическая роль в ферментативном механизме трансформации метаболических потоков *Rh. steppense* при аэробном хемотрофном типе культивирования. Разработана гипотетическая схема участия различных изоформ малатдегидрогеназы в осуществлении процессов адаптивной реакции бактериального метаболизма к новым стрессовым условиям роста.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Изоферменты изоцитратлиазы и их роль у организмов различного уровня организации / А. Т. Епринцев [и др.] // Успехи современной биологии. – 2013. – Т. 133, № 6. – С. 550–563.
2. Климова М. А. Очистка ферментов и методы исследования их каталитических свойств / М. А. Климова, А. Т. Епринцев. – Воронеж : Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2008. – 35 с.
3. Нетрусов А. И. Микробиология / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – М. : Академия, 2012. – 384 с.
4. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул / Л. А. Остерман. – М. : Мир, 1983. – 297 с.
5. Получение и свойства изоформ изоцитратлиазы из семян *Glycine max* L / А. Т. Епринцев [и др.] // Прикл. Биох. Микроб. – 2010. – Т. 46, № 1. – С. 103–108.
6. A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function / M. Kunze [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – Vol. 1763, No. 12. – P. 1441–1452.
7. Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments / N. Coquelle [et al.] // J. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 374, No. 2. – P. 547–562.
8. Adaptive response of *Amphibacillus xylanus* to normal aerobic and forced oxidative stress conditions / D. Mochizuki [et al.] // Microbiology. – 2014. – Vol. 160, No. 2. – P. 340–352.
9. Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP / Y. H. Ko [et al.] // BBRC. – 2004. – Vol. 324. – P. 263–274.
10. Alteration of coenzyme specificity of malate dehydrogenase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) by site-directed mutagenesis / Y. D. Ge [et al.] // Genet. Mol. Res. – 2014. – Vol. 13, No. 3. – P. 5758–5766.

11. Alternative splicing regulates targeting of malate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* / P. Kabran [et al.] // DNA Res. – 2012. – Vol. 19, No. 3. – P. 231–244.
12. Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations / S. Karlin [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2002. – Vol. 99, No. 1. – P. 333–338.
13. Anaerobic, alkaliphilic, saccharolytic bacterium *Alkalibacter saccharofermentans* gen. nov., sp. nov. from a soda lake in the Transbaikal region of Russia / E. S. Garnova [et al.] // Extremophiles. – 2004. – Vol. 8, No. 4. – P. 309–316.
14. An alphaproteobacterium capable of both aerobic and anaerobic anoxygenic photosynthesis but incapable of photoautotrophy: *Charonomicrobium ambiphototrophicum*, gen. nov., sp. nov. / J. T. Csotonyi [et al.] // Photosynth. Res. – 2011. – Vol. 107. – P. 257–268.
15. Analysis of *Nanoarchaeum equitans* genome and proteome composition: indications for hyperthermophilic and parasitic adaptation / S. Das [et al.] // Genome Res. 7:186. – 2006. – URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-186> (дата обращения: 21.04.2017).
16. Analysis of protein-solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei* / K. L. Britton [et al.] // PNAS. USA. – 2006. – Vol. 103, No. 13. – P. 4846–4851.
17. Analysis of the *Desulfovibrio gigas* transcriptional unit containing rubredoxin (*rd*) and rubredoxin-oxygen oxidoreductase (*roo*) genes and upstream ORFs / G. Silva [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – Vol. 280, No. 2. – P. 491–502.
18. A new family of NAD(P)H-dependent oxidoreductases distinct from conventional Rossmann-fold proteins / H. Muramatsu [et al.] // J. Biosci. Bioengineering. – 2005. – Vol. 99, No. 6. – P. 541–547.
19. An experimental point of view on hydration/solvation in halophilic proteins / R. Talon [et al.] // Front. Microbiol. – 2014. – URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00066> (дата обращения: 09.05.2017).

20. An extremely halophilic proteobacterium combines a highly acidic proteome with a low cytoplasmic potassium content / R. Deole [et al.] // J. Biol. Chem. – 2013. – Vol. 288, No. 1. – P. 581–588.
21. Another unusual type of citric acid cycle enzyme in *Helicobacter pylori*: the malate:quinone oxidoreductase / B. Kather [et al.] // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182, No. 11. – P. 3204–3209.
22. A novel malate dehydrogenase from *Ceratonia siliqua* L. seeds with potential biotechnological applications / C. Muccio [et al.] // Protein J. – 2012. – Vol. 31, No. 8. – P. 667–673.
23. A novel NAD-binding protein revealed by the crystal structure of 2,3-diketo-L-gulonate reductase (YiaK) / F. Forouhar [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, No. 13. – P. 13148–13155.
24. A novel Th1-type T-cell immunity-biasing effect of malate dehydrogenase derived from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* via the activation of dendritic cells / W. S. Kim [et al.] // Cytokine. 104:14-22. – 2018. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.01.022> (дата обращения: 20.03.2018).
25. A nucleocytoplasmic malate dehydrogenase regulates p53 transcriptional activity in response to metabolic stress / S. M. Lee [et al.] // Cell Death and Differentiation. – 2009. – Vol. 16, No. 5. – P. 738–748.
26. An Y. Purification and characterization of the plastid-localized NAD-dependent malate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* / Y. An, Y. Cao, Y. Xu // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2016. – Vol. 63, No. 4. – P. 490–496.
27. A unified model of protein dynamics / H. Frauenfelder [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2009. – Vol. 106. – P. 5129–5134.
28. Bairoch A. The ENZYME database in 2000 / A. Bairoch // Nucleic Acids Research. – 2000. – Vol. 28, No. 1. – P. 304–305.
29. Baldwin R. L. Energetics of protein folding / R. L. Baldwin // J. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 371, No. 2. – P. 283–301.

30. Berg I. A. Inhibition of acetate and propionate assimilation by itaconate via propionyl-CoA carboxylase in isocitrate lyase-negative purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* / I. A. Berg, V. Filatova, R. N. Ivanovsky // FEMS Microbiol. Letters. – 2002. – Vol. 216. – P. 49–54.
31. Biochemical analysis of the NAD⁺-dependent malate dehydrogenase, a substrate of several serine/threonine protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis* / X. M. Wang // PLoS One. 10(4):e0123327. – 2015. – URL: <https://doi:10.1371/journal.pone.0123327> (дата обращения: 21.04.2017).
32. Biosynthesis of amino acids of the glutamate and aspartate families, alanine, and polyamines. In *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells / B. R. Belitsky [et al.]. – Washington D.C. : ASM Press, 2002. – 231 p.
33. Boshoff H. I. M. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth / H. I. M. Boshoff, C. E. Barry // Nat. Rev. Microbiol. – 2005. – Vol. 3, No 1. – P. 70–80.
34. Bramer C. O. The malate dehydrogenase of *Ralstonia eutropha* and functionality of the C(3)/C(4) metabolism in a Tn5-induced *mdh* mutant / C. O. Bramer, A. Steinbuchel // FEMS Microbiol. Letters. – 2002. – Vol. 212, No. 2. – P. 159–164.
35. Brownian dynamic study of an enzyme metabolon in the TCA cycle: substrate kinetics and channeling / Y. M. Huang [et al.] // Protein Sci. – 2018. – Vol. 27, No. 2. – P. 463–471.
36. Brune A. Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations / A. Brune, P. Frenzel, H. Cypionka // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – Vol. 24, No. 5. – P. 691–710.
37. Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat / E. Basha [et al.] // Eur. J. Biochem. – 2004. – Vol. 271, No. 8. – P. 1426–1436.
38. Capes M. D. The core and unique proteins of haloarchaea / M. D. Capes, P. DasSarma, S. DasSarma // BMC Genomics 13:39. – 2012. – URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/39> (дата обращения: 19.03.2017).

39. Chakraborty D. Stay wet, stay stable? How internal water helps the stability of thermophilic proteins / D. Chakraborty, A. Taly, F. Sterpone // J. Phys. Chem. B. – 2015. – Vol. 119, No. 40. – P. 12760–12770.
40. Characterization of a novel complex from halophilic archaeobacteria, which displays chaperone-like activities in vitro / B. Franzetti [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 2906–2914.
41. Characterization of *Ire1* in the yeast *Yarrowia lipolytica* reveals an important role for the *Sls1* nucleotide exchange factor in unfolded protein response regulation / A. Babour [et al.] // Current Genet. – 2008. – Vol. 53, No. 6. – P. 337–346.
42. Characterization of the immunogenicity and pathogenicity of malate dehydrogenase in *Brucella abortus* / X. Han [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol. 30, No. 7. – P. 2063–2070.
43. Charnock C. MDH from *Chlorobium vibrioforme*, *Chlorobium tepidum*, and *Heliobacterium gestii*: purification, characterization, and investigation of dinucleotide binding by dehydrogenases by use of empirical methods of protein sequence analysis / C. Charnock, U. H. Refseth, R. Sirevag // Journal of Bacteriology. – 1992. – Vol. 174. – P. 1307–1313.
44. Chen J. Amide hydrogen exchange shows that malate dehydrogenase is a folded monomer at pH 5 / J. Chen, D. L. Smith // Protein Sci. – 2001. – Vol. 10, No. 5. – P. 1079–1083.
45. Cloning, overexpression, purification and crystallization of malate dehydrogenase from *Thermus thermophiles* / Y. Y. Chang // Acta Crystallographica Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. – 2013. – Vol. 69. – P. 1249–1251.
46. Clustal W and Clustal X version 2.0. / M.A. Larkin [et al.] // Bioinformatics. – 2007. – Vol. 23, No. 21. – P. 2947–2948.
47. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* / F. W. Larimer [et al.] // Nature Biotechnol. – 2004. – Vol. 22, No. 1. – P. 55–61.

48. Complex formation between malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* is regulated by tricarboxylic acid cycle metabolites / M. Bartholomae [et al.] // FEBS Journal. – 2014. – Vol. 281, No. 4. – P. 1132–1143.
49. Costantini S. Amino acid propensities for secondary structures are influenced by the protein structural class / S. Costantini, G. Colonna, A. M. Facchiano // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – Vol. 342, No. 2. – P. 441–451.
50. Costenaro L. Link between protein-solvent and weak protein-protein interactions gives insight into halophilic adaptation / L. Costenaro, G. Zaccai, C. Ebel // Biochemistry. – 2002. – Vol. 41. – P. 13245–13252.
51. Crystallization and preliminary diffraction studies of malate dehydrogenase from *Streptomyces aureofaciens* / D. Mikulasova [et al.] // Protein Pept. Lett. – 2006. – Vol. 13, No. 2. – P. 207–210.
52. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of tetrameric malate dehydrogenase from the novel Antarctic psychrophile *Flavobacterium frigidimaris* KUC-1 / T. Fujii [et al.] // Acta Crystallographica Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. – 2007. – Vol. 63, No. 11. – P. 983–986.
53. Crystal structures and molecular dynamics simulations of thermophilic malate dehydrogenase reveal critical loop motion for co-substrate binding / C. H. Hung [et al.] // PLoS One 8(12):e83091. – 2013. – URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083091> (дата обращения: 12.04.2017).
54. Cypionka H. Oxygen respiration by *Desulfovibrio species* / H. Cypionka // Annual Rev. Microbiol. – 2000. – Vol. 54. – P. 827–848.
55. Deutch C. E. L-Malate dehydrogenase activity in the reductive arm of the incomplete citric acid cycle of *Nitrosomonas europaea* / C. E. Deutch // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2013. – Vol. 104, No. 5. – P. 645–655.
56. Development of a *Propionibacterium-Escherichia coli* shuttle vector for metabolic engineering of *Propionibacterium jensenii*, an efficient producer of

- propionic acid / X. Zhuge [et al.] // *Appl. Environmental Microbiol.* – 2013. – Vol. 79, No. 15. – P. 4595–4602.
57. Differences in the oligomeric states of the LDH-like L-MalDH from the hyperthermophilic archaea *Methanococcus jannaschii* and *Archaeoglobus fulgidus* / D. Madern [et al.] // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40, No. 34. – P. 10310–10316.
58. Dishisha T. Batch- and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici* / T. Dishisha, M. T. Alvarez, R. Hatti-Kaul // *Bioresource Technol.* – 2012. – Vol. 118. – P. 553–562.
59. Dong Y. Temperature adaptation of cytosolic malate dehydrogenases of limpets (genus *Lottia*): differences in stability and function due to minor changes in sequence correlate with biogeographic and vertical distributions / Y. Dong, G. N. Somero // *J. Experimental Biol.* – 2009. – Vol. 212, No. 2. – P. 169–177.
60. DrwH, a novel WHY domain-containing hydrophobic LEA5C protein from *Deinococcus radiodurans*, protects enzymatic activity under oxidative stress / S. Jiang [et al.] // *Sci. Rep.* 7(1):9281. – 2017. – URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09541-2> (дата обращения: 28.10.2017).
61. *Escherichia coli* MDH, a novel solubility enhancer for heterologous proteins synthesized in *Escherichia coli* / J. S. Park [et al.] // *Biotechnol. Lett.* – 2007. – Vol. 29, No. 10. – P. 1513–1518.
62. Evolutionary roots and diversification of the genus *Aeromonas* / A. Sanglas [et al.] // *Front. Microbiol.* 8:8:127. – 2017. – URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00127> (дата обращения: 12.05.2017).
63. Evolution of *Cryptosporidium parvum* lactate dehydrogenase from malate dehydrogenase by a very recent event of gene duplication / D. Madern [et al.] // *Mol. Biol. Evolution* – 2004. – Vol. 21, No. 3. – P. 489–497.

64. Exogenous gamma and alpha/beta interferon rescues human macrophages from cell death induced by *Bacillus anthracis* / J. A. Gold [et al.] // Infect. Immun. – 2004. – Vol. 72, No. 3. – P. 1291–1297.
65. Exploring the metabolomic responses of *Bacillus licheniformis* to temperature stress by gas chromatography/mass spectrometry / Z. Dong [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. – 2018. – URL: <https://doi:10.4014/jmb.1708.08019> (дата обращения: 15.03.2018).
66. Expression and identification of a thermostable malate dehydrogenase from multicellular prokaryote *Streptomyces avermitilis* MA-4680 / Z. D. Wang [et al.] // Mol. Biol. Rep. – 2011. – Vol. 38, No. 3. – P. 1629–1636.
67. Features of structural organization and expression regulation of malate dehydrogenase isoforms from *Rhodobacter sphaeroides* strain 2R / A. T. Eprintsev [et al.] // Biochemistry. – 2009. – Vol. 74, No. 7. – P. 793–799.
68. Fenchel T. Oxygen and the spatial structure of microbial communities / T. Fenchel, B. Finlav // Biol. Rev. Camb. Philos. Society. – 2008. – Vol. 83, No. 4. – P. 553–569.
69. Filatova L. V. A study of the mechanism of acetate assimilation in purple nonsulfur bacteria lacking the glyoxylate shunt: enzymes of the citramalate cycle in *Rhodobacter sphaeroides* / L. V. Filatova // Microbiologiya. – 2005. – Vol. 74. – P. 319–328.
70. Fleming P. J. Protein packing: dependence on protein size, secondary structure and amino acid composition / P. J. Fleming, F. M. Richards // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 299, No. 2. – P. 487–498.
71. Functional characterization of the unconventional splicing of *Yarrowia lipolytica* *HAC1* mRNA induced by unfolded protein response / M. H. Oh [et al.] // Yeast. – 2010. – Vol. 27, No. 7. – P. 443–452.
72. Function, kinetic properties, crystallization, and regulation of microbial malate dehydrogenase / T. Takahashi-Iniguez // Journal of Zhejiang university-science B. – 2016. – Vol. 17, No. 4. – P. 247–261.

73. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum* / D. Molenaar [et al.] // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182, No. 24. – P. 6884–6891.
74. Genome evolution in yeasts / B. Dujon [et al.] // Nature. – 2004. – Vol. 430, No. 6995. – P. 35–44.
75. Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead sea / N. S. Baliga [et al.] // Genom Res. – 2004. – Vol. 14, No. 11. – P. 2221–2234.
76. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350 / Y. Ohnishi [et al.] // J. Bacteriol. – 2008. – Vol. 190, No. 11. – P. 4050–4060.
77. Global protein-level responses of *Halobacterium salinarum* NRC-1 to prolonged changes in external sodium chloride concentrations / S. Leuko [et al.] // J. Proteome Res. – 2009. – Vol. 8. – P. 2218–2225.
78. Gradual adaptive changes of a protein facing high salt concentrations / N. Coquelle [et al.] // J. Mol. Biol. – 2010. – Vol. 404, No. 3. – P. 493–505.
79. Gradual neofunctionalization in the convergent evolution of trichomonad lactate and malate dehydrogenases / P. A. Steindel [et al.] // Protein Sci. – 2016. – Vol. 25, No. 7. – P. 1319–1331.
80. Graupner M. The first examples of (S)-2-hydroxyacid dehydrogenases catalyzing the transfer of the pro-4S hydrogen of NADH are found in the archaea / M. Graupner, R. H. White // Biochim. Biophys. Acta – Protein Struct. Mol. Enzym. – 2001. – Vol. 1548, No. 1. – P. 169–173.
81. Graziano G. Molecular bases of protein halotolerance / G. Graziano, A. Merlino // Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics. – 2014. – Vol. 184, No. 4. – P. 850–858.
82. Growth of the obligate anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough under continuous low oxygen concentration sparging: impact of the membrane-bound oxygen reductases / F. Ramel [et al.] // PLoS One. 10(4):e0123455. – 2015. –

URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123455> (дата обращения: 09.05.2017).

83. Gunka K. Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation / K. Gunka, F. M. Commichau // *Molecular Microbiology*. – 2012. – Vol. 85, No. 2. – P. 213–224.
84. Hall M. D. Crystal structure of a ternary complex of *Escherichia coli* malate dehydrogenase citrate and NAD at 1.9 Å resolution / M. D. Hall, K. J. Banaszak // *J. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 232, No. 4. – P. 213–222.
85. Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* / S. B. Richard [et al.] // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39, No. 5. – P. 992–1000.
86. Halophilic enzyme activation induced by salts / G. Ortega [et al.] // *Sci. Rep.* – 2011. – Vol. 1. – P. 176–184.
87. Han Q. Chorion peroxidase-mediated NADH/O₂ oxidoreduction cooperated by chorion malate dehydrogenase-catalyzed NADH production: a feasible pathway leading to H₂O₂ formation during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes / Q. Han, G. Li, J. Li // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1523, No. 2-3. – P. 246–253.
88. *Helicobacter pylori*: physiology and genetics / H. L. T. Mobley [et al.]. – Washington (DC): ASM Press, 2001. – 128 p.
89. How enzymes adapt: lessons from directed evolution / F. H. Arnold [et al.] // *Tr. Bioch. Sci.* – 2001. – Vol. 26. – P. 100-106.
90. Hutcheon G. W. Characterisation of a highly stable alpha-amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica* / G. W. Hutcheon, N. Vasisht, A. Bolhuis // *Extremophiles*. – 2005. – Vol. 9, No. 6. – P. 487–495.
91. Identification and biochemical characterization of a thermostable MDH from the mesophile *Streptomyces coelicolor* A3(2) / Y. D. Ge [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2010. – Vol. 74, No. 11. – P. 2195–2202.

92. Imhoff J. F. The phototrophic alpha-proteobacteria / J. F. Imhoff // Prokaryotes. – 2006. – Vol. 5. – P. 41–64.
93. Improved amino acid flexibility parameters / D. K. Smith [et al.] // Protein Sci. – 2003. – Vol. 12, No. 5. – P. 1060–1072.
94. Improved production of propionic acid in *Propionibacterium jensenii* via combinational overexpression of glycerol dehydrogenase and malate dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae* / L. Liu [et al.] // Appl. Environmental Microbiol. – 2015. – Vol. 81, No. 7. – P. 2256–2264.
95. Improved propionic acid production from glycerol with metabolically engineered *Propionibacterium jensenii* by integrating fed-batch culture with a pH-shift control strategy / X. Zhuge [et al.] // Bioresource Technol. – 2014. – Vol. 152. – P. 519–525.
96. Insights into the molecular relationships between malate and lactate dehydrogenases: structural and biochemical properties of monomeric and dimeric intermediates of a mutant of tetrameric L-[LDH-like] malate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* / D. Madern [et al.] // Biochemistry. – 2000. – Vol. 39, No. 5. – P. 1001–1010.
97. Interface matters: the stiffness route to stability of a thermophilic tetrameric malate dehydrogenase / M. Kalimeri [et al.] // PLoS One 9(12):e113895. – 2014. – URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113895> (дата обращения: 06.05.2017).
98. In vivo measurement of internal and global macromolecular motions in *Escherichia coli* / M. Jasnin [et al.] // Biophys. J. – 2008. – Vol. 95. – P. 857–864.
99. Ionic network at the C-terminus of the beta-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: functional role in the quaternary structure thermal stabilization / B. Cobucci-Ponzano [et al.] // Proteins: Struct. Funct. Genet. – 2002. – Vol. 48. – P. 98–106.

100. Isolation and properties of malate dehydrogenase from meso- and thermophilic bacteria / A. T. Eprintsev [et al.] // Prikl. Biokhim. Mikrobiol. – 2006. – Vol. 42, No. 3. – P. 274–278.
101. Isolation and purification of malate dehydrogenase isoforms from phototrophic purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospseudomonas palustris* / A. T. Eprintsev [et al.] // Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol. – 2008. – Vol. 6. – P. 680–687.
102. Jaenicke R. Stability and stabilization of globular proteins in solution / R. Jaenicke // J. Biotechnol. – 2000. – Vol. 79, No. 3. – P. 193–203.
103. Joghee N. N. Biochemical changes induced by salt stress in halotolerant bacterial isolates are media dependent as well as species specific / N. N. Joghee, G. Jayaraman // Prep. Biochem. Biotechnol. – 2016. – Vol. 46, No. 1. – P. 8–14.
104. Joo W. A. Proteomics of halophilic archaea / W. A. Joo, C. W. Kim // J. Chromatogr. B Analytical Technol. Biomed. Life Sci. – 2005. – Vol. 815, No. 1-2. – P. 237–250.
105. Jung T. Interaction of enzymes of the tricarboxylic acid cycle in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*: a comparative study / T. Jung, M. Mack // FEMS Microbiol. Letters. – 2018. – URL: <https://doi:10.1093/femsle/fny055> (дата обращения: 16.03.2018).
106. Karshikoff A. Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a “traffic rule” for hot roads / A. Karshikoff, R. Ladenstein // Trends Biochem. Sci. – 2001. – Vol. 26. – P. 550–556.
107. Kayser K. J. New host-vector system for *Thermus spp.* based on the malate dehydrogenase gene / K. J. Kayser, J. J. Kilbane 2nd // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183, No. 5. – P. 1792–1795.
108. Key features of the two-intron *Saccharomyces cerevisiae* gene *SUS1* contribute to its alternative splicing / M. A. Hossain [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2011. – Vol. 39. – P. 8612–8627.

109. Kirby R. R. Cloning and primary structure of putative cytosolic and mitochondrial malate dehydrogenase from the mollusc *Nucella lapillus* (L.) / R. R. Kirby // Gene. – 2000. – Vol. 245, No. 1. – P. 81–88.
110. Kompantseva E. I. *Rhodovulum steppense* sp. nov., an obligately haloalkaliphilic purple nonsulfur bacterium widespread in saline soda lakes of Central Asia / E. I. Kompantseva, A. V. Komova, N. A. Kostrikina // I. J. S. E. Microb. – 2010. – Vol. 60. – P. 1210–1214.
111. Kreil D. P. Identification of thermophilic species by the amino acid compositions deduced from their genomes / D. P. Kreil, C. A. Ouzounis // Nucleic Acids Research. – 2001. – Vol. 29, No. 7. – P. 1608–1615.
112. Large improvement in the thermal stability of a tetrameric MDH by single point mutations at the dimer–dimer interface / A. Bjork [et al.] // J. M. B. – 2004. – Vol. 341. – P. 1215–1226.
113. Laskowski R. A. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery / R. A. Laskowski, M. B. Swindells // J. of Chem. Inf. and Mod. – 2011. – Vol. 51, No. 10. – P. 2778–2786.
114. Lozupone C. A. Global patterns in bacterial diversity / C. A. Lozupone, R. Knight // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 11436–11440.
115. Lu C. D. Complete sequence of the *Salmonella typhimurium* gene encoding MDH / C. D. Lu, A. T. Abdelal // Gene. – 1993. – Vol. 123. – P. 143–144.
116. Lynn D. J. Synonymous codon usage is subject to selection in thermophilic bacteria / D. J. Lynn, G. A. Singer, D. A. Hickey // Nucleic Acids Research. – 2002. – Vol. 30, No. 19. – P. 4272–4277.
117. Madern D. Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family / D. Madern // J. Molecular Evol. – 2002. – Vol. 54, No. 6. – P. 825–840.
118. Malate dehydrogenase: a useful phylogenetic marker for the genus *Aeromonas* / M. Farfan [et al.] // Systematic and Applied Microbiology. – 2010. – Vol. 33. – P. 427–435.

119. Malate dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Vulcanithermus medioatlanticus* / A. T. Eprintsev [et al.] // *Biochemistry (Mosc)*. – 2005. – Vol. 70, No. 2. – P. 1027–1030.
120. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels / A. Shevchenko [et al.] // *Anal. Chem.* – 1996. – Vol. 68. – P. 850–858.
121. Matsuoka D. Prediction of hydration structures around hydrophilic surfaces of proteins by using the empirical hydration distribution functions from a database analysis / D. Matsuoka, M. Nakasako // *J. Phys. Chem. B*. – 2010. – Vol. 114, No. 13. – P. 4652–4663.
122. Meister M. L-Malyl-coenzyme A/b-methylmalyl-coenzyme A lyase is involved in acetate assimilation of the isocitrate lyase-negative bacterium *Rhodobacter capsulatus* / M. Meister // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – P. 1415–1425.
123. Membrane-bound oxygen reductases of the anaerobic sulfate-reducing *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*: roles in oxygen defence and electron link with periplasmic hydrogen oxidation / F. Ramel [et al.] // *Microbiology*. – 2013. – Vol. 159, No. 12. – P. 2663–2673.
124. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 to produce L-malate. / X. Dong [et al.] // *Biotechnol Bioeng.* – 2016. – URL: <https://doi.org/10.1002/bit.26190> (дата обращения: 13.04.2017).
125. Methylophony in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view / L. V. Chistoserdova [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – P. 2980-2987.
126. Meyer F. M. Malate metabolism in *Bacillus subtilis*: distinct roles for three classes of malate-oxidizing enzymes / F. M. Meyer, J. Stulke // *FEMS Microbiol. Letters*. – 2013. – Vol. 339. – P. 17–22.
127. Microbial source tracking by DNA sequence analysis of the *Escherichia coli* malate dehydrogenase gene / K. M. Ivanetich [et al.] // *J. Microbiol. Methods*. – 2006. – Vol. 67, No. 3. – P. 507–526.

128. Millisecond time scale conformational flexibility in a hyperthermophile protein at ambient temperature / G. Hernandez [et al.] // PNAS USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 3166–3170.
129. Molecular adaptation and salt stress response of *Halobacterium salinarum* cells revealed by neutron spectroscopy / P. Vauclare [et al.] // Springer: Extremophiles. – 2015. – Vol. 19. – P. 1099–1107.
130. Molecular cloning, purification and immunogenicity of recombinant *Brucella abortus* 544 malate dehydrogenase protein / A. W. Reves [et al.] // J. Vet. Sci. – 2016. – Vol. 17, No. 1. – P. 119–122.
131. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes / S. Paul [et al.] // Gen. Biol. – 2015. – Vol. 9. – R70.
132. Mori H. Determination of D-Malate using immobilized D-malate dehydrogenase in a flow system and its application to analyze the D-malate content of beverages / H. Mori, H. Shiraki // J. Health Sci. – 2008. – Vol. 54, No. 1. – P. 72–75.
133. Mutations in *Mdh2*, encoding a Krebs cycle enzyme, cause early-onset severe encephalopathy / S. Ait-El-Mkadem [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2017. – Vol. 100, No. 1. – P. 151–159.
134. *Natranaerobaculum magadiense* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, alkalithermophilic bacterium from soda lake sediment / D. G. Zavarzina [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – Vol. 63, No. 12. – P. 4456–4461.
135. Nelson D. L. Principles of biochemistry / D. L. Nelson, M. C. Lehninger. – New York : W. H. Freeman and company, 2008. – 1158 p.
136. N-methyl-L-amino acid dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. A novel member of an unusual NAD(P)-dependent oxidoreductase superfamily / H. Mihara [et al.] // FEBS Journal. – 2005. – Vol. 272, No. 5. – P. 1117–1123.
137. New insight into the photoheterotrophic growth of the isocitrate lyase-lacking purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* on acetate / B. Leroy [et al.] // Microbiology. – 2015. – Vol. 161, No. 5. – P. 1061–1072.

138. Ohshima T. Dye-linked L-malate dehydrogenase from thermophilic *Bacillus species* DSM 465. Purification and characterization / T. Ohshima, S. Tanaka // Eur. J. Biochem. – 1993. – Vol. 214, No. 1. – P. 37–42.
139. Oren A. *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties / A. Oren // FEMS Microbiol. Lett. – 2013. – Vol. 342. – P. 1–9.
140. Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits / T. J. McGenity [et al.] // Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 2. – P. 243–250.
141. Overexpression of *hlyB* and *mdh* genes confers halotolerance in *Fremyella diplosiphon*, a freshwater cyanobacterium / B. Tabatabai [et al.] // Enzyme Microb. Technol. 103:12-17. – 2017. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.04.009> (дата обращения: 28.10.2017).
142. Oxidation-reduction properties of two engineered redox-sensitive mutant *Escherichia coli* malate dehydrogenases / A. Setterdahl [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 2000. – Vol. 382, No. 1. – P. 15–21.
143. Oxidative and cellular metabolic stress of *Oreochromis mossambicus* as biomarkers indicators of trace element contaminants / N. Kumar [et al.] // Chemosphere. 171:265-274. – 2017. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.066> (дата обращения: 25.09.2017).
144. Overexpression of *hlyB* and *mdh* genes confers halotolerance in *Fremyella diplosiphon*, a freshwater cyanobacterium / B. Tabatabai [et al.] // Enzyme Microb. Technol. 103:12-17. – 2017. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.04.009> (дата обращения: 28.10.2017).
145. Pathway for H₂O₂ and O₂ detoxification in *Clostridium acetobutylicum* / O. Riebe [et al.] // Microbiology. – 2009. – Vol. 155, No. 1. – P. 16–24.
146. Pcal_1699, an extremely thermostable malate dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis* / Gharib G. [et al.] // Extremophiles. – 2016. – Vol. 20. – P. 57–67.

147. Pei J. PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments / J. Pei, B. H. Kim, N. V. Grishin // *Nucleic acids research*. – 2008. – Vol. 36, No. 7. – P. 2295-2300.
148. Physicochemical, catalytic, and regulatory properties of malate dehydrogenase from *Rhodovulum steppense* bacteria, strain A-20s / A. T. Eprintsev [et al.] // *Biology Bulletin*. – 2014. – Vol. 41, No. 6. – P. 486–492.
149. Physicochemical properties of malate dehydrogenase from the bacterium *Rhodopseudomonas palustris* strain f8pt / A. T. Eprintsev [et al.] // *Biochemistry (Mosc)*. – 2006. – Vol. 71, No. 6. – P. 692–695.
150. Plancarte A. Purification, properties, and kinetic studies of cytoplasmic malate dehydrogenase from *Taenia solium cysticerci* / A. Plancarte, G. Nava, G. Mendoza-Hernandez // *Parasitol. Res*. – 2009. – Vol. 105, No. 1. – P. 175–183.
151. Poggi C. G. Macromolecular crowding and the steady-state kinetics of malate dehydrogenase / C. G. Poggi, K. M. Slade // *Biochemistry*. 54(2):260-7. – 2015. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123327> (дата обращения: 15.10.2017).
152. Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene / K. S. Ko [et al.] // *Infect. Immun*. – 2004. – Vol. 72, No. 9. – P. 5253–5261.
153. Potential role of acetyl-CoA synthetase (*acs*) and malate dehydrogenase (*mae*) in the evolution of the acetate switch in *Bacteria* and *Archaea* / E. P. Barnhart [et al.] // *Scientific Reports* 5:12498. – 2015. – URL: <http://www.nature.com/scientificreports/10.1038/srep12498> (дата обращения: 18.04.2017).
154. Production of succinate by a *pflB ldhA* double mutant of *Escherichia coli* overexpressing malate dehydrogenase / W. Wang [et al.] // *Bioproc. Biosyst. Eng*. – 2009. – Vol. 32, No. 6. – P. 737–745.
155. Protein flexibility and intrinsic disorder / P. Radivojac [et al.] // *Protein Sci*. – 2004. – Vol. 13, No. 1. – P. 71–80.

156. Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of Henle's loop (TALH) cells / H. Dihazi [et al.] // *Mol. Cell Proteomics*. – 2005. – Vol. 4, No. 10. – P. 1445–1458.
157. Proteomic analysis of normal expression differences exist in *Bacillus subtilis* 168 cultivation / J. Q. Wang [et al.] // *Curr. Microbiol.* – 2018. – URL: <https://doi:10.1007/s00284-018-1451-y> (дата обращения: 15.03.2018).
158. Purification and characterization of membrane-bound malate dehydrogenase from *Acetobacter sp.* SKU 14 / E. Shinagawa [et al.] // *BBB*. – 2002. – Vol. 66. – P. 298–306.
159. Purification and physicochemical properties of malate dehydrogenase from bacteria of the genus *Beggiatoa* / A. T. Eprintsev [et al.] // *Biochemistry (Mosc)*. – 2003. – Vol. 68, No. 9. – P. 172–176.
160. Purification, cloning, and expression of the mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) from protoscolices of *Echinococcus granulosus* / F. Aguero [et al.] // *Mol. Biochem. Parasitol.* – 2004. – Vol. 137. – P. 207–214.
161. Purple non-sulfur photosynthetic bacteria monitor environmental stresses / M. Kis [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B*. 151:110-7. – 2015. – URL: <https://doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.07.017> (дата обращения: 26.10.2017).
162. Rapid metabolic analysis of *Rhodococcus opacus* PD630 via parallel 13C-metabolite fingerprinting / W. D. Hollinshead [et al.] // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2016. – Vol. 113, No. 1. – P. 91–100.
163. Refolding, characterization and crystal structure of (S)-MDH from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* / R. Kawakami [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – Vol. 1794, No. 10. – P. 1496–1504.
164. Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas* / P. Fareleira [et al.] // *Microbiology*. – 2003. – Vol. 149, No. 6. – P. 1513–1522.
165. *Rhodovulum tesquicola* sp. nov., a haloalkaliphilic purple non-sulfur bacterium from brackish steppe soda lakes / E. I. Kompantseva [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2012. – Vol. 62. – P. 2962–2966.

166. Role of malate dehydrogenase isoforms in the regulation of anabolic and catabolic processes in the colorless sulfur bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* D-402 / A. T. Eprintsev [et al.] // Mikrobiologiya. – 2004. – Vol. 73, No. 4. – P. 437–442.
167. Role of NAD⁺-dependent malate dehydrogenase in the metabolism of *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z and *Methylosinus trichosporium* OB3b / O. N. Rozova [et al.] // Microorganisms. – 2015. – Vol. 3, No. 1. – P. 47–59.
168. Roles of multiple acyl-CoA oxidases in the routing of carbon flow towards β -oxidation and polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Yarrowia lipolytica* / R. Haddouche [et al.] // FEMS Yeast Res. – 2008. – Vol. 10, No. 7. – P. 917–927.
169. Saito R. Amino acid substitutions in malate dehydrogenases of piezophilic bacteria isolated from intestinal contents of deep-sea fishes retrieved from the abyssal zone / R. Saito, C. Kato, A. Nakayama // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol. 52, No. 1. – P. 9–19.
170. Schlessinger A. Protein flexibility and rigidity predicted from sequence / A. Schlessinger, B. Rost // Proteins. – 2005. – Vol. 61, No. 1. – P. 115–126.
171. Selection of genes of *Mycobacterium tuberculosis* upregulated during residence in lungs of infected mice / V. Srivastava [et al.] // Tuberculosis (Edinb). – 2008. – Vol. 88, No 3. – P. 171–177.
172. Self-protection of cytosolic malate dehydrogenase against oxidative stress in *Arabidopsis* / J. Huang [et al.] // J. Exp. Bot. – 2017. – URL: [https:// doi: 10.1093/jxb/erx396](https://doi.org/10.1093/jxb/erx396) (дата обращения: 21.11.2017).
173. Sequence analysis of housekeeping genes *recA*, *dnaE*, and *mdh* in different serogroups or biotypes of *Vibrio cholerae* isolated from China / Y. Y. Rui [et al.] // Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. – 2006. – Vol. 26, No. 12. – P. 1720–1723.
174. Shimazaki Y. Determination of malic acid using a malate dehydrogenase reactor after purification and immobilization in non-denaturing conditions and staining with ponceau S / Y. Shimazaki, T. Sakikawa // Protein Pept. Lett. – 2010. – Vol. 17, No. 8. – P. 1048–1052.

175. Solvent interactions of halophilic malate dehydrogenase / C. Ebel [et al.] // Biochemistry. – 2002. – Vol. 41. – P. 13234–13244.
176. Soppa J. From genomes to function: haloarchaea as model organisms / T. Ohshima, S. Tanaka // Microbiology. – 2006. – Vol. 152, No. 3. – P. 585–590.
177. Strahl H. The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* R1 responds to potassium limitation by expression of the K-transporting KdpFABC P-type ATPase and by a decrease in intracellular K / H. Strahl, J. C. Greie // Extremophiles. – 2008. – Vol. 12. – P. 741–752.
178. Stogner S. W. Oxygen toxicity / S. W. Stogner, D. K. Payne // Ann. Pharmacother. – 1992. – Vol. 26, No. 12. – P. 1554–1562.
179. Structural basis for cold adaptation. Sequence, biochemical properties, and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum* / S. Y. Kim [et al.] // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, No. 17. – P. 11761–11767.
180. Structural basis for the alteration of coenzyme specificity in a malate dehydrogenase mutant / T. Tomita [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – Vol. 347, No. 2. – P. 502–508.
181. Structural basis for the aminoacid composition of proteins from halophilic Archea / X. Tadeo [et al.] // PLoS Biol. – 2009. – Vol. 7. – P. 12–17.
182. Structural basis for thermophilic protein stability: structures of thermophilic and mesophilic MDHs / B. Dalhus [et al.] // J. Mol. Biol. – 2002. – Vol. 318, No. 3. – P. 707–721.
183. Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases: crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase, alpha-ketomalonnate and tetrahydroNAD / A. D. Chapman [et al.] // J. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 285, No. 2. – P. 703–712.
184. Structural-functional transformation of the malate dehydrogenase system of the bacterium *Sphaerotilus sp.* strain D-507 depending on nutritional mode / A. T. Eprintsev [et al.] // Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol. – 2009. – Vol. 3. – P. 269–275.

185. Structure and function of *Plasmodium falciparum* malate dehydrogenase: role of critical amino acids in co-substrate binding pocket / A. Pradhan [et al.] // *Biochimie*. – 2009. – Vol. 91, No. 11-12. – P. 1509–1517.
186. Structure of a dioxygen reduction enzyme from *Desulfovibrio gigas* / C. Frazao [et al.] // *Microbiology*. – 2000. – Vol. 7, No. 11. – P. 1041–1045.
187. Structures of citrate synthase and malate dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* / D. M. Ferraris [et al.] // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. – 2015. – URL: <http://dx.doi.org/10.1002/prot.24743> (дата обращения: 16.04.2017).
188. Studying the lysine acetylation of malate dehydrogenase / S. Venkat [et al.] // *J. Mol. Biol.* 429(9):1396-1405. – 2017. – URL: <http://doi:10.1016/j.jmb.2017.03.027> (дата обращения: 29.10.2017).
189. Study of an alternate glyoxylate cycle for acetate assimilation by *Rhodobacter sphaeroides* / B. E. Alber [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2006. – Vol. 61, No. 2. – P. 297–309.
190. Substrate polypeptide presents a load on the apical domains of the chaperonin GroEL / F. Motojima [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2004. – Vol. 101, No. 42. – P. 15005–15012.
191. *SUS1* introns are required for efficient mRNA nuclear export in yeast / B. Cuenca-Bono [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Vol. 39. – P. 8599–8611.
192. Synstad B. Malate dehydrogenase from the green gliding bacterium *Chloroflexus aurantiacus* is phylogenetically related to lactic dehydrogenases / B. Synstad, O. J. Emmerhoff, R. Sirevag // *Arch. Microbiol.* – 2008. – Vol. 165. – P. 346–353.
193. Synthesis of *Mycoplasma* arginine deiminase in *E. coli* using stress-responsive proteins / K. Y. Ahn [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* – 2014. – Vol. 63. – P. 46–49.
194. Tank M. Communities of purple sulfur bacteria in a Baltic Sea coastal lagoon analyzed by puf LM gene libraries and the impact of temperature and NaCl concentration in experimental enrichment cultures / M. Tank, M. Blumel,

- J. F. Imhoff // FEMS Microbiol. Ecology. – 2011. – Vol. 78, No. 2. – P. 428–438.
195. TCA cycle-independent acetate metabolism via the glyoxylate cycle in *Saccharomyces cerevisiae* / Y. J. Lee [et al.] // Yeast. – 2011. – Vol. 28, No. 2. – P. 153–166.
196. Tetrameric and dimeric malate dehydrogenase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes / G. R. Hunter [et al.] // Mol. Biochem. Parasitol. – 2000. – Vol. 105, No. 2. – P. 203–214.
197. The *Bacillus subtilis* ywka gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM two-component system in response to malate / T. Doan [et al.] // Microbiology. – 2003. – Vol. 149, No. 9. – P. 2331–2343.
198. The crystal structure of *Haloferax volcanii* proliferating cell nuclear antigen reveals unique surface charge characteristics due to halophilic adaptation / J. A. Winter [et al.] // BMC Str. B. – 2009. – Vol. 9. – P. 55–61.
199. The effect of salts on the activity and stability of *Escherichia coli* and *Haloferax volcanii* dihydrofolate reductases / D. B. Wright [et al.] // J. Mol. Biol. – 2002. – Vol. 323, No. 2. – P. 327–344.
200. The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity / H. Bolhuis [et al.] // BMC Genomics 7:169. – 2006. – URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-169> (дата обращения: 21.04.2017).
201. The mitochondrial malate dehydrogenase 1 gene *GhmMDH1* is involved in plant and root growth under phosphorus deficiency conditions in cotton / Z. A. Wang [et al.] // Sci. Rep. – 2015. – URL: <https://doi.org/10.1038/srep10343> (дата обращения: 10.05.2017).
202. The oligomeric states of *Haloarcula marismortui* malate dehydrogenase are modulated by solvent components as shown by crystallographic and biochemical studies / A. Irimia [et al.] // J. Mol. Biol. – 2003. – Vol. 326, No. 3. – P. 859–873.

203. Three novel proteins co-localise with polyhydroxybutyrate (PHB) granules in *Rhodospirillum rubrum* S1 / T. Narancic [et al.] // Microbiology. – 2018. – URL: <https://doi:10.1099/mic.0.000642> (дата обращения: 15.03.2018).
204. Thioredoxin-h1 reduces and reactivates the oxidized cytosolic malate dehydrogenase dimer in higher plants / S. Hara [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281, No. 43. – P. 32065–32071.
205. Th2-related immune responses by the *Brucella abortus* cellular antigens, malate dehydrogenase, elongation factor, and arginase / Y. B. Im // Microb. Pathog. 110:7-13. – 2017. – URL: <https://doi:10.1016/j.micpath.2017.06.019> (дата обращения: 15.10.2017).
206. Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility / R. M. Kramer [et al.] // Biophys. J. – 2012. – Vol. 102. – P. 1907–1915.
207. Toward systems metabolic engineering of *Streptomyces* for secondary metabolites production / H. L. Robertsen [et al.] // Biotechnol. J. – 2018. – URL: <https://doi:10.1002/biot.201700465> (дата обращения: 10.03.2018).
208. Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array / M. Hayashi [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2002. – Vol. 66, No. 6. – P. 1337–1344.
209. Trevino S. R. Amino acid contribution to protein solubility: Asp, Glu, and Ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in RNase Sa / S. R. Trevino, J. M. Scholtz, C. N. Pace // J. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 366. – P. 449–460.
210. Understanding the adaptation of *Halobacterium species* NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence / S. P. Kennedy [et al.] // Genome Res. – 2001. – Vol. 11, No. 10. – P. 1641–1650.
211. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria / S. Fukuchi [et al.] // J. Mol. Biol. – 2003. – Vol. 327, No. 2. – P. 347–357.

212. van der Rest M. E. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli* / M. E. van der Rest, D. Molenaar, C. Frank // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182, No. 24. – P. 6892–6899.
213. Wang L. Comparison of alkyl hydroperoxide reductase and two water-forming NADH oxidases from *Bacillus cereus* ATCC 14579 / L. Wang, H. Chong, R. Jiang // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 96, No. 5. – P. 1265–1273.
214. Water in a changing world / R. B. Jackson [et al.] // *Ecol. Appl.* – 2001. – Vol. 11. – P. 1027–1045.
215. Wieringa E. B. Detection of abundant sulphate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach / E. B. Wieringa, J. Overmann, H. Cypionka // *Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 2, No. 4. – P. 417–427.
216. Yennaco L. J. Characterization of malate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum* / L. J. Yennaco, Y. Hu, J. F. Holden // *Extremophiles.* – 2007. – Vol. 11, No. 5. – P. 741–746.
217. Yew W. S. Utilization of L-ascorbate by *Escherichia coli* K-12: assignments of functions to products of the yjf-sga and yia-sgb operons / W. S. Yew, J. A. Gerlt // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184, No. 1. – P. 302–306.
218. Yin Y. Identification of functional paralog shift mutations: conversion of *Escherichia coli* malate dehydrogenase to a lactate dehydrogenase / Y. Yin, K. M. Meneely, J. F. Kirsch // *PNAS USA.* – 2007. – Vol. 104, No. 44. – P. 17353–17357.
219. Yueh A.Y. Purification and molecular properties of MDH from the marine diatom *Nitzschia alba* / A. Y. Yueh, C. S. Chung, Y. K. Lai // *J. of Bioch.* – 1989. – Vol. 258, No. 1. – P. 221–228.
220. Zaccai G. Hydration shells with a pinch of salt / G. Zaccai // *Biopolymers.* – 2013. – Vol. 99, No. 4. – P. 233–238.

221. Zaitseva J. Structure of *Escherichia coli* malate dehydrogenase at 1.45 Å resolution / J. Zaitseva, K. M. Meneely, A. L. Lamb // Acta Crystallographica Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. – 2009. – Vol. 65, No. 9. – P. 866–869.
222. Zeldovich K. B. Protein and DNA sequence determinants of thermophilic adaptation / K. B. Zeldovich, I. N. Berezovsky, E. I. Shakhnovich // PLoS Comput. Biol. 3(1):e5. – 2007. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030005> (дата обращения: 21.04.2017).
223. Zhao J. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on ¹³C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method / J. Zhao, K. Shimizu // J. Biotechnol. – 2003. – Vol. 101, No. 2. – P. 101–117.