

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**

Специальность 03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2018

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

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

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

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

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова».

Защита состоится 19 июня 2018 года в 15:00 часов на заседании
диссертационного совета Д 212.038.03 при Воронежском государственном
университете по адресу: 394018, Воронеж, Университетская пл. 1, ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке
Воронежского государственного университета и на сайте Воронежского
государственного университета: <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан «26» апреля 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Биохимические адаптации прокариотических организмов 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 являются хорошими модельными системами для изучения механизмов адаптивных реакций клеточного метаболизма в целом, а также изменений конкретных ферментных систем.

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 компенсации стрессов различной природы (Lee, 2009).

У всех прокариот, при отсутствии явления изоферментного полиморфизма, обнаружена единственная форма МДГ, 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 (Епринцев и др., 2014).

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 *Rh. 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 *Rh. steppense* штамм А-20s и их роли в адаптивной реакции бактериального метаболизма при смене типов питания и условий культивирования.

Для выполнения поставленной цели были сформулированы соответствующие задачи:

1. Выявить появление индуцибельных изоформ МДГ 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 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 O_2 . 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.

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. 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 (например, для производства биологически активных мутантных микробных кутиназ).

Научные положения диссертации включены в материалы лекций и спецкурсов на медико-биологическом факультете Воронежского университета.

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 с международным участием 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 (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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект и методы исследования. Исследование функционирования малатдегидрогеназной системы проводилось у типичных представителей аноксигенных фототрофных бактерий *Rhodovulum steppense* A-20s^T, устойчивых к высоким концентрациям NaCl и обитающих в содовых мелководных озерах засушливых зон юго-восточного Забайкалья.

Питательные среды для культивирования бактерий. Культивирование галоалкалофильных микроорганизмов *Rh. steppense* осуществляли аэробно в экстремальных условиях при отсутствии света с использованием питательной

среды Пфеннинга: дистиллированная H_2O – 1 л; KH_2PO_4 – 0.45 г; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.45 г; NH_4Cl – 0.45 г; Na_2SO_4 – 0.45 г; KCl – 0.45 г; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.1 г; дрожжевой экстракт – 0.25 г; ацетат натрия – 1.5 г; pH среды 8-8.5 (Pfennig, Lippert, 1966). Концентрации вносимых в стерильную среду растворов витаминов и микроэлементов составляли 1.0×10^{-3} г/л.

Определение ферментативной активности. Активность малатдегидрогеназы определяли при 340 нм спектрофотометрическим методом на СФ-56. Фотометрическая среда, используемая для измерения активности энзима при протекании обратной реакции, содержала следующие компоненты (pH 8.5): 0.05 М буфер трис-НСl, 0.001 М оксалоацетат, 0.2 мМ НАДН.

За единицу ферментативной активности МДГ принимали такое количество фермента, которое превращало (обратная реакция) или образовывало (прямая реакция) 1 мкМ НАДН за 1 минуту при 25 °С.

Активность ИЦЛ определяли спектрофотометрически при 324 нм на основании показателей детектируемого прироста оптической плотности (Епринцев, 2010).

Спектрофотометрическое определение активности каталазы проводили при $\lambda = 240$ нм в течение 3 минут, а супероксиддисмутазы – при 560 нм в соответствии со способностью данного фермента оказывать ингибирующее влияние на фотохимический процесс восстановления нитросинего тетразолия (Полесская, 2004).

Модифицированная схема ферментативной очистки. Для исследования на электрофоретически гомогенных препаратах энзиматических характеристик трех молекулярных форм МДГ, была разработана и проведена 4-х стадийная очистка фермента, включающая: I. получение ферментативных экстрактов; II. гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-25; III. ионообменную хроматографию; IV. гель-хроматографию на колонке с сефадексом G-200. Для проведения ионообменной хроматографии использовали ДЭАЭ-сефацел и осуществляли элюирование фермента линейным градиентом хлористого калия.

Электрофоретические исследования. Для анализа электрофоретической подвижности и выявления новых индуцибельных изоформ МДГ у представителей галоалкалофильных микроорганизмов *Rh. steppense* был проведен электрофорез в

нативном полиакриламидном геле (Ornstein, Davis, 1964).

Метод специфического проявления ферментов. Для специфического проявления МДГ применяли тетразолиевый метод (Епринцев, Климова, 2008). Проявление гелей осуществляли при значении рН 9.0 для повышения специфичности метода из-за возможного присутствия малик-энзимов.

Исследование кинетических характеристик и регуляции энзиматической активности. Кинетические и регуляторные свойства изоформ МДГ изучали на гомогенных препаратах. Были установлены значения величин констант Михаэлиса, субстратного ингибирования и ингибирования цитратом. Для построения графиков использовали компьютерные программы, позволяющие проводить обработку полученных данных соответствующими методами (Климова и др, 2008).

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 (Shevchenko, 1996). Масс-спектрометрический пептидный фингерпринт-анализ выполнен на масс-спектрометре Ultraflex II MALDI TOF (Bruker Corporation, Bremen, Germany).

Выделение 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).

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

Подбор вырожденных и специфических праймеров. Разработку и подбор вырожденных праймеров осуществляли с помощью анализа определенных консервативных участков, выявленных путем выравнивания и сравнения известных последовательностей гена *mdh* из бактерий различных таксономических групп (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Подбор специфической последовательности

праймеров проводили на основе сиквенса ампликона *mdh* из *Rh. steppense* штамм А-20s^T с использованием программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>): прямой – 5'-GCTTGACGCGATGGTTTGGG-3'; обратный – 5'-AGCCCATGTCCACCAGATCG-3'.

Проведение ПЦР-РВ. Для осуществления ПЦР в реальном времени использовали LightCycler 96 («Roche», Швейцария), красителем при проведении процесса реакции выступал SYBR Green I. Для расчета величин относительных уровней транскриптов гена *mdh* была использована следующая формула: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Методы вариационной статистики в процессе обработки данных.

Проведение экспериментов осуществлялось в восьми биологических повторностях, аналитические измерения для проб – в трех повторностях; при обработке опытных данных использовался критерий Стьюдента (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция новых изоформ МДГ у бактерий *Rh. steppense*. В оптимальных условиях роста при анаэробном фототрофном типе культивирования *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. 1).

Таким образом, биосинтез двух дополнительных индуцибельных изоформ в стрессовых условиях можно считать механизмом адаптивной реакции клеточного метаболизма исследуемых микроорганизмов.

Многостадийная схема очистки исследуемого энзима. В результате проведения специально разработанной 4-х стадийной очистки исследуемого фермента были получены электрофоретически гомогенные препараты трех изоформ МДГ в условиях аэробного хемотрофного роста галоалкалофильных *Rh. steppense*. При этом величины их удельной активности равнялись: для МДГ 1 – 6.253 Е/мг; для МДГ 2 – 5.942 Е/мг; для МДГ 3 – 6.990 Е/мг белка. Степень очистки составила: 65, 61 и 72 раза, соответственно.

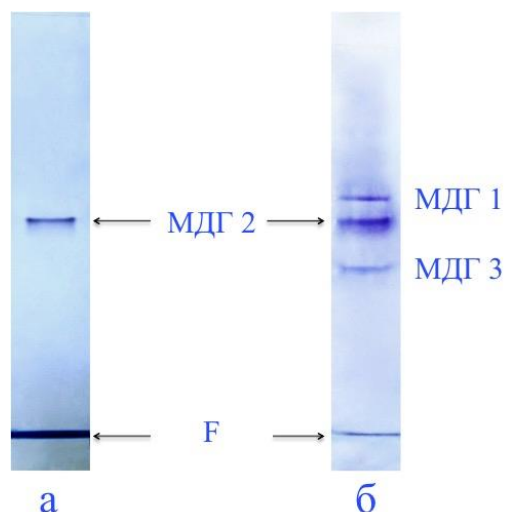


Рис. 1. Электрофореграмма изоформ малатдегидрогеназы из *Rh. steppense* при смене типов питания: а – фототрофный рост в анаэробных условиях; б – хемотрофный рост в присутствии кислорода; F – фронт бромфенолового синего.

Для каждого из трех полученных пиков малатдегидрогеназной активности при универсальном и специфическом проявлении была обнаружена одна единственная полоса с относительной электрофоретической подвижностью 0.43 (МДГ 1), 0.51 (МДГ 2), а для МДГ 3 данный показатель составил 0.67 (рис. 2).

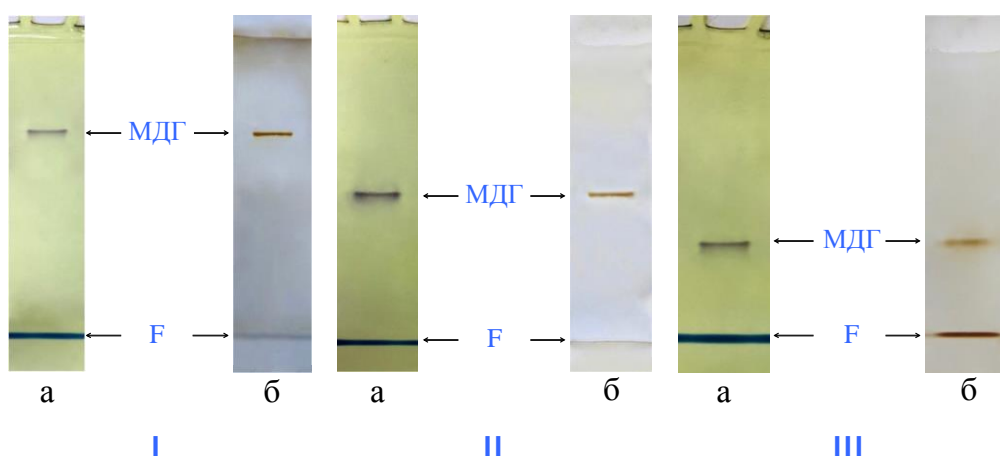


Рис. 2. Электрофоретическое исследование изоформ МДГ из бактерий *Rh. steppense* A-20s в нативном ПААГ: I – МДГ 1, II – МДГ 2, III – МДГ 3; а – окрашивание тетразолиевым методом; б – проявлении с AgNO_3 ; F – фронт красителя.

Значения молекулярной массы и анализ субъединичного строения молекулярных форм МДГ. Установлено, что фермент МДГ из *Rh. steppense* при хемотрофном типе культивирования имеет важную структурную особенность: представляет собой октамер, тетрамер и димер одинаковых субъединиц. Рассчитанные значения молекулярных масс нативных МДГ 1, МДГ 2 и МДГ 3 из исследуемого объекта: 280, 142 и 72 кДа. Результаты исследования с помощью

и регуляторным характеристикам, что может иметь важное значение для их специфического участия в процессах трансформации клеточного метаболизма *Rh. steppense*.

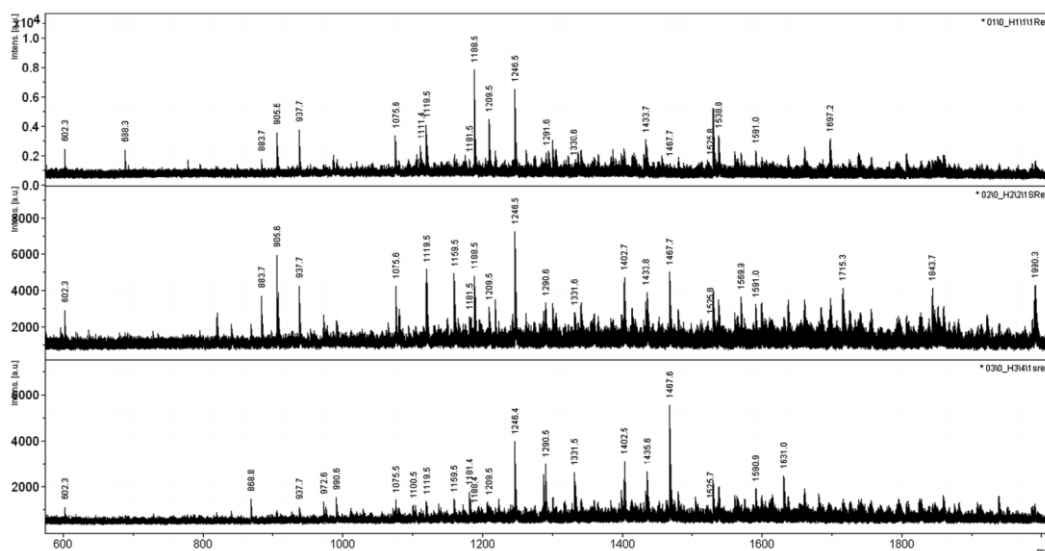


Рис. 4. Масс-спектрометрическая пептидная карта изоформ МДГ (PMF после ферментативного гидролиза *in situ* очищенных белковых полос олигомерных форм энзима в SDS-ПААГ) из *Rh. steppense*. Сверху вниз: МДГ 1, МДГ 2, МДГ 3.

Таблица 1.

Кинетические и регуляторные характеристики изоформ МДГ из *Rh. steppense* A-20s

Свойства	МДГ 1	МДГ 2	МДГ 3
Оптимум pH (ОА)	9.5	8.0	8.5
Оптимум pH (малат)	10.5	9.0	9.5
Температурный оптимум (ОА)	45 °С	55°С	50°С
Температурный оптимум (малат)	40°С	40°С	45°С
K_M (ОА), мкМ	200	35	52
K_M (малат), мкМ	943.4	2200.0	1766.8
K_M (НАДН), мкМ	135.0	66.7	82.9
K_M (НАД ⁺), мкМ	250.0	107.3	127.2
K_i (ОА), мМ	8.0	1.9	2.2
K_i (Цитрат), мкМ	60	30	400
K_a (Mg ²⁺), мМ	5.1	8.1	4.7
K_i (Ba ²⁺), мМ	11.4	9.2	16.0
K_i (K ⁺), мМ	3.6	4.0	3.8

Функционирование МДГ при индукции глиоксилатного цикла. В стрессовых аэробных условиях роста бактерий *Rh. steppense* в темноте наблюдается индукция активности ИЦЛ, что свидетельствует о функционировании глиоксилатного цикла. При данном типе питания у исследуемых микроорганизмов выявлено появление изоформы МДГ 3, которая принимает участие в обеспечении работы ГЦ.

Проведение анализа с использованием итаконата (ингибитора ГЦ) позволило продемонстрировать исчезновение полосы МДГ 3 в ПААГ (рис. 5).

Функционирование МДГ из *Rh. steppense* в условиях оксидативного стресса. При хемотрофном типе культивирования *Rh. steppense* в присутствии O_2 была выявлена индукция дополнительных олигомерных форм малатдегидрогеназы. В данных условиях наблюдается существенное увеличение активности антиоксидантных ферментов (СОД и каталазы) и происходит переключение реакций ЦТК на выполнение энергетических функций, а не участия в конструктивном метаболизме (Zaccari, 2004).

С помощью электрофоретического исследования малатдегидрогеназной ферментной системы продемонстрировано исчезновение полосы МДГ 1 в ПААГ при хемотрофном культивировании бактерий, но в бескислородных условиях (рис. 6).

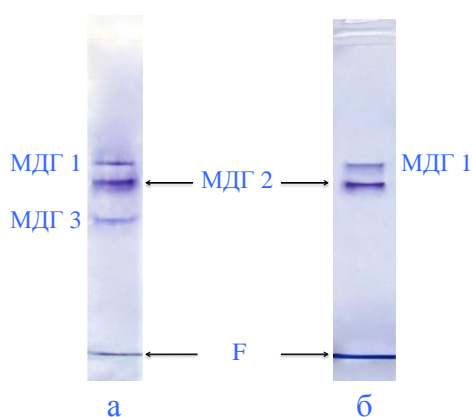


Рис. 5. Электрофоретический анализ малатдегидрогеназной системы из *Rh. steppense*: а – аэробный хемотрофный рост; б – аэробный хемотрофный рост в присутствии итаконата; F – фронт бромфенолового синего.

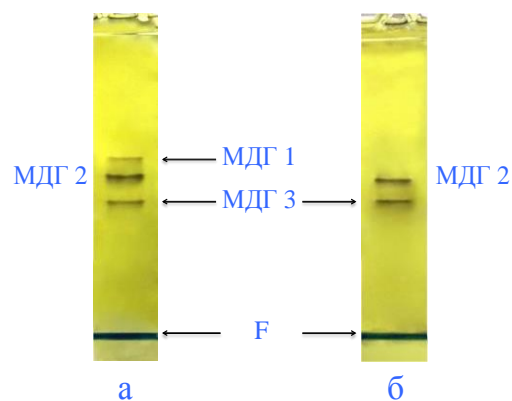


Рис. 6. Электрофоретический анализ малатдегидрогеназной системы из *Rh. steppense*: а – хемотрофный рост в присутствии O_2 ; б – хемотрофный рост в бескислородных условиях; F – фронт бромфенолового синего.

Особенности экспрессии гена *mdh* из *Rh. steppense*. До настоящего времени аннотирование генома *Rh. steppense* A-20s 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. При выявлении консервативных участков осуществляли выравнивание нуклеотидных последовательностей *mdh* из *Rh. sphaeroides* 2.4.1. (Copeland, 2013) и бактерий различных таксономических групп.

Результаты сравнения секвенированной последовательности ампликона *mdh* из *Rh. steppense* с генетической базой данных показали высокий процент сходства с соответствующими фрагментами последовательностей генов, ответственных за синтез МДГ из других бактерий. 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. 7). На основе сиквенса ампликона гена исследуемого фермента был осуществлен подбор и синтез специфической последовательности олигонуклеотидов.

Rh. palustris	CCGCTCGACGCCATGGTCTGGGCGCTGCAGAAGGCCCTCCGGGCTGCCGACCCG-CAAGGT
Rh. sphaeroides	CCGCTCGACGCCATGGTCTGGGCGCTGCAGCAATTCCTCGGGCCTG-CCGGCCGAGAAGGT
Seq	CCGCTCGACGCCATGGTCTGGGCGCTGCAGCAATTCCTCGGGCCTG-CCGGCCGAGAAGGT
Rh. sp. MB263	CCGCTCGACGCCATGGTCTGGGCGCTGCAGCAATTCCTCGGGCCTG-CCGGCCGAGAAGGT
Rh. sulfidophilum	*****
Rh. palustris	GGTCCGGCATGGCCGGCGTGTCTGACTCCGCCCGGTTCCGCTATTTCCCT-GGCCGACGAAT
Rh. sphaeroides	GGTGGGCATGGCCGGCGTGTCTGACTCCGGCGCGCTTCCGGCATTTCTGTCTG-GTTCGAGT
Seq	CGTGGGCATGGCCGGCGTGTCTGACTCCGGCGCGCTTCCGGCATTTCTGTCTG-AGCCTGGAAT
Rh. sp. MB263	CGTCCGGCATGGCCGGCGTGTCTGACTCCGGCGCGCTTCCGGCATTTCTGTCTG-AGCCTGGAAT
Rh. sulfidophilum	CGTCCGGCATGGCCGGCGTGTCTGACTCCGGCGCGCTTCCGGCATTTCTGTCTG-AGCCTGGAAT
Rh. palustris	**
Rh. sphaeroides	**
Seq	**
Rh. sp. MB263	**
Rh. sulfidophilum	**
Rh. palustris	TCAAAGTCTCGGTGGAAGACGTACCCGCCTTCGTGCTGGGGCGCCATGGCGACACCATGG
Rh. sphaeroides	TCAAAGTCTCGGTGGAAGACGTACCCGCCTTCGTGCTGGGGCGCCATGGCGACACCATGG
Seq	TCAAAGTCTCGGTGGAAGACGTACCCGCCTTCGTGCTGGGGCGCCATGGCGACACCATGG
Rh. sp. MB263	TCAAAGTCTCGGTGGAAGACGTACCCGCCTTCGTGCTGGGGCGCCATGGCGACACCATGG
Rh. sulfidophilum	TCAAAGTCTCGGTGGAAGACGTACCCGCCTTCGTGCTGGGGCGCCATGGCGACACCATGG
Rh. palustris	*****
Rh. sphaeroides	*****
Seq	*****
Rh. sp. MB263	*****
Rh. sulfidophilum	*****
Rh. palustris	TGCCGCTGGTG-AAGTACTCCACCGTGGCCGGCATCCCGTGCACCGATCGGTGAAGATG
Rh. sphaeroides	TGCCGCTGGTG-CGCTACTCGACCGTGGCCGGCATCCCGTGCACCGATCGGTGAAGATG
Seq	TGCCGCTGGA-CGCGCTATTCACCGTGGCCGGCATCCCGTGCACCGATCGGTGAAGATG
Rh. sp. MB263	TGCCGCTGGA-CGCGCTATTCACCGTGGCCGGCATCCCGTGCACCGATCGGTGAAGATG
Rh. sulfidophilum	TGCCGCTGGA-CGCGCTATTCACCGTGGCCGGCATCCCGTGCACCGATCGGTGAAGATG
Rh. palustris	*****
Rh. sphaeroides	*****
Seq	*****
Rh. sp. MB263	*****
Rh. sulfidophilum	*****
Rh. palustris	GGCTGGACCTCGCAGGCCCGGCTCGACGAGATCGTGCAGCCGACCCGCAACGGCGGGCGC
Rh. sphaeroides	GGCTGGACCTCGCAGGCCCGGCTCGACGAGATCGTGCAGCCGACCCGCAACGGCGGGCGC
Seq	GGCTGGACCTCGCAGGCCCGGCTCGACGAGATCGTGCAGCCGACCCGCAACGGCGGGCGC
Rh. sp. MB263	GGCTGGACCTCGCAGGCCCGGCTCGACGAGATCGTGCAGCCGACCCGCAACGGCGGGCGC
Rh. sulfidophilum	GGCTGGACCTCGCAGGCCCGGCTCGACGAGATCGTGCAGCCGACCCGCAACGGCGGGCGC
Rh. palustris	*****
Rh. sphaeroides	*****
Seq	*****
Rh. sp. MB263	*****
Rh. sulfidophilum	*****

Рис. 7. Нуклеотидные последовательности ампликона гена *mdh* из *Rh. steppense* A-20s (Seq) и соответствующих фрагментов *mdh* из *Rh. palustris*, *Rh. sphaeroides*, *Rh. species* MB263, *Rh. sulfidophilum* DSM 1374.

Для комплексного изучения особенностей адаптации малатдегидрогеназной ферментной системы в зависимости от условий культивирования бактерий *Rh. steppense* (присутствия или отсутствия индуцибельных изоформ) было проведено исследование экспрессии гена, кодирующего 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. 8).

Сравнительный анализ относительного уровня транскриптов *mdh* при разных типах культивирования *Rh. steppense* показал, что в условиях хемотрофного аэробного роста (ферментная система из исследуемого объекта при данном типе культивирования была 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 (0.457 Е/мг) из *Rh. steppense*, культивируемых анаэробно на свету (рис. 9). Прямая зависимость удельной активности МДГ от уровня экспрессии *mdh* свидетельствует о том, что повышение каталитической активности связано с увеличением концентрации мРНК гена, кодирующего исследуемый энзим, и синтезом дополнительных изоформ МДГ в условиях стресса.

Исследование динамики появления индуцибельных изоформ МДГ. При проведении аналитического электрофореза в нативном ПААГ было установлено, что на второй день аэробного хемотрофного типа культивирования *Rh. steppense* появляется изоформа МДГ 1 с электрофоретической подвижностью $R_f = 0.43$, а на четвертый день становится заметной МДГ 3 с $R_f = 0.67$.

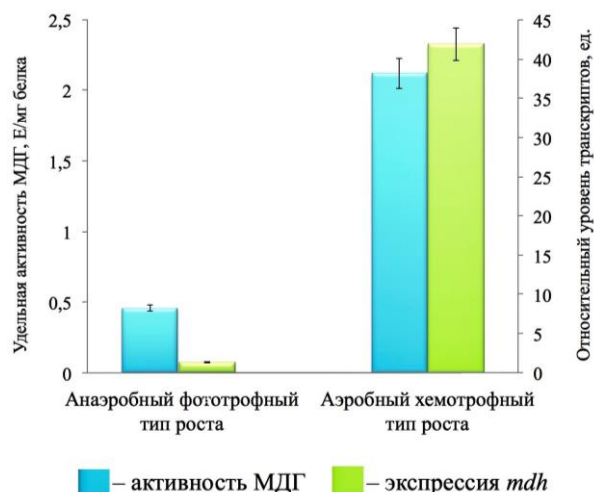
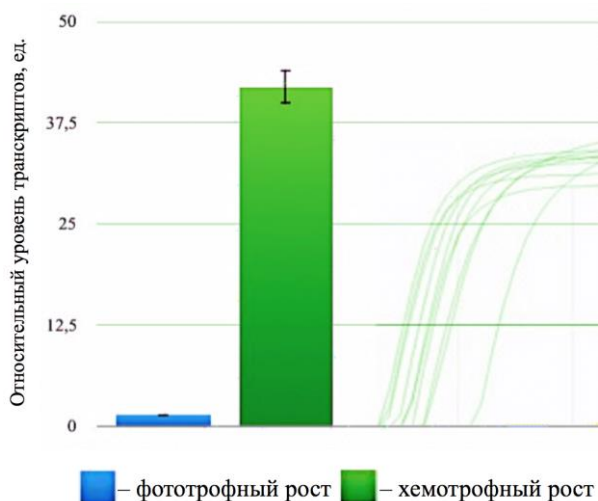


Рис. 8. Относительный уровень транскриптов гена *mdh* из *Rh. steppense* при разных типах культивирования: синим цветом выделен фототрофный рост в анаэробных условиях; зеленым – хемотрофный рост в присутствии O_2 .

Рис. 9. Удельная активность и относительный уровень транскриптов гена *mdh* из *Rh. steppense* при разных типах культивирования.

С применением метода ПЦР в реальном времени продемонстрирована зависимость изменения содержания мРНК для гена, кодирующего МДГ, от времени культивирования микроорганизмов (рис. 10). Полученные результаты коррелируют с исследованием динамики каталитической активности энзима.

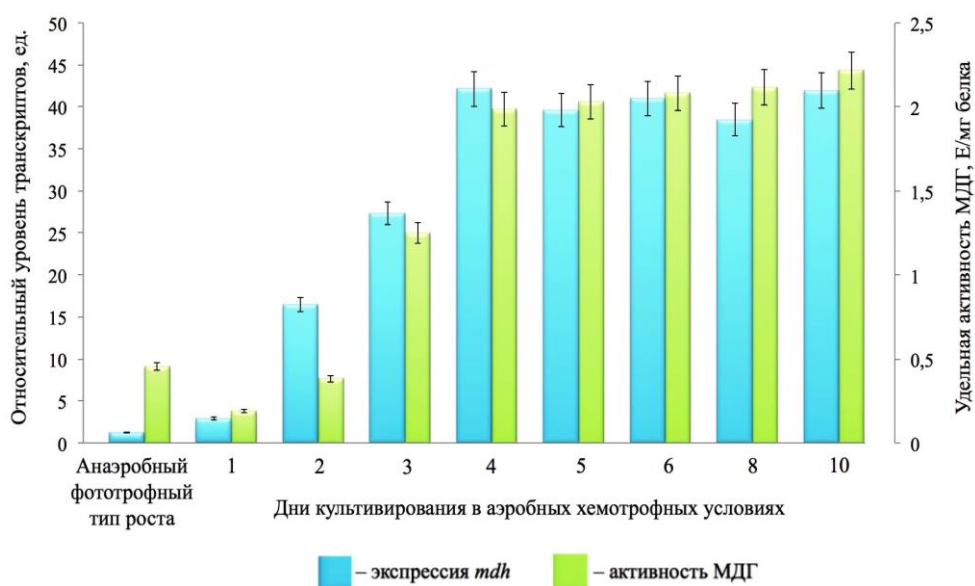


Рис. 10. Изменение относительного уровня транскриптов гена *mdh* и динамика активности МДГ при разных типах роста *Rh. steppense* и в зависимости от времени хемотрофного культивирования бактерий в присутствии O_2 .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы была получена новая информация о трансформации процессов метаболизма несерных пурпурных бактерий *Rh. steppense* штамм А-20s^T.

Установлено, что у галоалкалофильных *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 бактерий 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 4-х стадийной очистки фермента были получены электрофоретически гомогенные препараты всех трех молекулярных форм МДГ при хемотрофном культивировании *Rh. steppense* в присутствии кислорода, изучены и выявлены связанные с функциональной ролью определенные различия их каталитических и регуляторных свойств.

Впервые у исследуемых микроорганизмов 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 СОД и каталазы, что может свидетельствовать о наличии окислительного стресса, приводящего к переключению метаболических потоков и использованию других источников энергии у *Rh. steppense* (Епринцев, 2018). 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

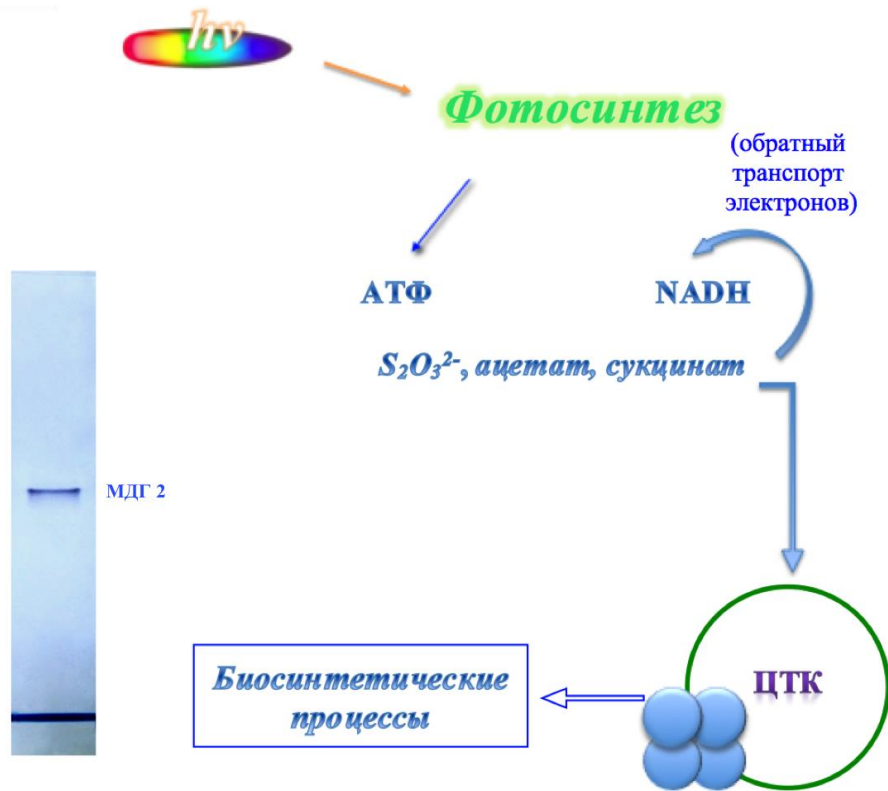
единственным геном в геномной ДНК *Rh. steppense* и являются изоформами, образующимися в результате посттрансляционной модификации путем олигомеризации одинаковых субъединиц. Кроме того, были продемонстрированы определенные изменения интенсивности работы гена, кодирующего исследуемый фермент. Повышение 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 (Madigan, 2003). Концентрация мРНК МДГ в клетках микроорганизмов значительно ниже, чем при культивировании *Rh. steppense* аэробно в темноте, и малатдегидрогеназа представлена только одной конститутивной формой исследуемого фермента. При переводе микроорганизмов в стрессовые условия, а именно: при отсутствии света и в присутствии O₂, происходит активация ГЦ, переключение ЦТК на осуществление энергетической функции в клетке, повышение активности антиоксидантных ферментов. Соответственно, наблюдается индукция экспрессии гена *mdh* 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 *Rh. steppense* 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. 11).

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 хемотрофном типе культивирования бактерий *Rh. steppense* штамм А-20s.

Анаэробный фототрофный тип роста



Аэробный хемотрофный тип роста

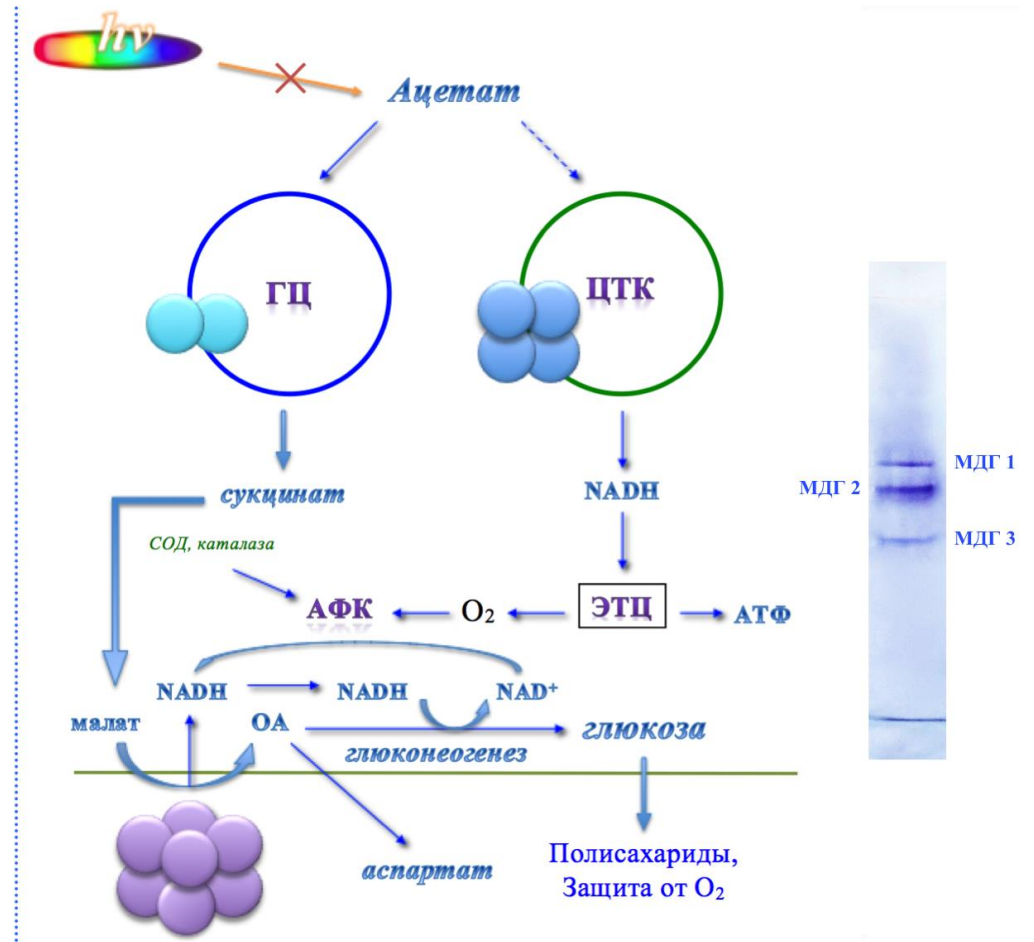


Рис. 11. Гипотетическая схема функционирования малатдегидрогеназной ферментной системы при разных типах культивирования бактерий *Rh. steppense*.

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 энзима: 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 (сродство, степень устойчивости к субстратам и др.), обусловленные специфической функциональной ролью каждой из молекулярных форм энзима 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 энзим 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 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Третьякова А.Ю., **Лященко М.С.**, Колесникова Н.В. [и др.]. Физико-химические свойства фумаратгидратазы из бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ. – 2013. – Выпуск 15. – Стр. 126-129.
2. **Лященко М.С.**, Третьякова А.Ю., Фалалеева М.И. Очистка и каталитические свойства сукцинатдегидрогеназы из бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ. – 2013. – Выпуск 15. – Стр. 199-202.
3. **Лященко М.С.** Исследование активного центра МДГ из бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s // Биология наука XXI века: сборник тезисов. – 2013 – Выпуск 17. – Стр. 173–175.
4. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., **Лященко М.С.** [и др.]. Физико-химические, каталитические и регуляторные характеристики малатдегидрогеназы из бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s // Известия РАН. Сер. биологическая. – 2014. – № 6. – С. 557–564.
5. **Лященко М.С.**, Гатаулина М.О., Паневина Т. В. Особенности четвертичной структуры изоформ малатдегидрогеназы из бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s, культивируемых в различных условиях // Организация и

- регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ. – 2015. – Выпуск 17. – Стр. 133–137.
6. **Лященко М.С.**, Гатауллина М.О. Очистка и каталитические свойства малатдегидрогеназы из бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s // Биология наука XXI века: сборник тезисов. – 2015 – Выпуск 19. – Стр. 138–139.
 7. **Лященко М.С.** Влияние температуры на активность изоформ малатдегидрогеназы из бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s, культивируемых в хемотрофных условиях // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ. – 2016. – Выпуск 18. – Стр. 100–104.
 8. **Лященко М.С.**, Паневина Т.В., Фалалеева М.И. [и др.]. Влияние разных концентраций ионов водорода на активность изоформ малатдегидрогеназы из бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s, культивируемых в хемотрофных условиях // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ – 2016. – Выпуск 18. – Стр. 104–107.
 9. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., **Лященко М.С.** [и др.]. Изоформы малатдегидрогеназы бактерий *Rhodovulum steppense* А-20s, культивируемых хемотрофно в аэробных условиях // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52, №2 – Стр. 168–173.
 10. **Лященко М.С.**, Епринцев А.Т., Фалалеева М.И. [и др.]. Влияние различных ионов металлов и интермедиатов на активность изоформ малатдегидрогеназы из бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s, культивируемых хемотрофно в аэробных условиях // Вестник ВГУ. – 2017. – №3 – Стр. 70–75.
 11. **Лященко М.С.**, Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. Очистка и каталитические свойства дополнительной изоформы малатдегидрогеназы из бактерий *Rhodovulum steppense* А-20s, культивируемых в хемотрофных условиях в темноте // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ – 2017. – Выпуск 19. – Стр. 111–116.
 12. А.Т. Eprintsev, М.И. Falaleeva, **M.S. Lyashchenko** [et al.]. Oligomeric forms of bacterial malate dehydrogenase: a study of the enzyme from the phototrophic non-sulfur bacterium *Rhodovulum steppense* А-20s // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2018. – Vol. 82, No. 1. – P. 81–89.

Работы № 4, 9, 10, 12 опубликованы в печатных изданиях, состоящих в списке журналов, рекомендованных ВАК РФ; № 4, 9 и 12 – индексируемых Web of Science.