

## Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Лященко Майи Сергеевны «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», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Биохимические адаптации прокариотических организмов к различным типам питания характеризуются широкими возможностями, что связано, в частности, с функционированием их ферментных комплексов, прежде всего, энзимов ЦТК и глиоксилатного цикла. У всех прокариот, при отсутствии явления изоферментного полиморфизма, обнаружена единственная форма фермента малатдегидрогеназы (МДГ), которая может быть представлена олигомерными полипептидами, характеризующимися различным количеством субъединиц. Для некоторых видов бактерий установлено, что участие МДГ в таких процессах, как ЦТК и глиоксилатный цикл, связано с появлением изоформ, возникающих путем структурных перестроек белковой молекулы. В связи с этим выяснение и исследование образования, структурной организации и функциональной роли изоформ МДГ при осуществлении процессов биохимической адаптации бактерий *Rh. steppense* А-20s в условиях оксидативного стресса при хемотрофном типе культивирования представляется актуальной задачей.

**Целью** диссертационной работы Лященко Майи Сергеевны являлось 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 достижения поставленной цели диссертант сформулировал 8 задач, в которые входило:

- Выявить появление индуцибельных изоформ МДГ при переключении метаболизма *Rh. steppense*, обусловленном сменой типа питания с фототрофного при анаэробии на хемотрофный рост в кислородных условиях;
- 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;
- Провести сравнительный анализ значений величин относительных уровней транскриптов *mdh* при разных типах культивирования *Rh. steppense* и исследовать динамику появления индуцибельных изоформ МДГ;
- Выявить активность маркерного фермента глиоксилатного цикла – изоцитратлиазы – в аэробных условиях роста бактерий в темноте;
- Определить функциональную значимость трех олигомерных форм МДГ и предложить гипотетическую схему участия изоформ энзима в осуществлении адаптивной реакции клеточного метаболизма *Rh. steppense* к стрессовым условиям культивирования.

**Научная новизна.** Впервые осуществлено выделение электрофоретически гомогенных препаратов новых индуцибельных форм МДГ из *Rh. steppense* в аэробных условиях хемотрофного роста и показана важная роль структурно-функциональных изменений молекулы фермента в процессе адаптации

микроорганизмов. Установлено, что в аэробных условиях у бактерий индуцируется глиоксилатный цикл, о чем свидетельствует появление высокой активности изоцитратлиазы.

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 в условиях аэробного роста в темноте по сравнению с данным показателем из бактерий, выращенных анаэробно на свету.

**Практическая значимость.** Результаты диссертационной работы расширяют и углубляют знания о роли малатдегидрогеназной ферментной системы в адаптивной реакции бактериального метаболизма к изменениям типа питания, что способствует созданию целостной картины и современных представлений о механизмах трансформации метаболических потоков в клетках живых существ.

Материалы диссертации используются в учебном процессе на медико-биологическом факультете Воронежского госуниверситета при чтении лекций по биохимии, микробиологии, а также спецкурсах «Молекулярная биология», «Энзимология» и др. Полученные результаты применяются при проведении практикумов и выполнении курсовых, бакалаврских и магистерских работ.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы.

**Обзор литературы** содержит 4 раздела, в которых описаны и приведены особенности метаболизма пурпурных бактерий, структурно-функциональная характеристика МДГ и ее роль в адаптивных реакциях метаболизма галофильных прокариот, а также молекулярно-биологические аспекты функционирования малатдегидрогеназного комплекса у бактерий.

В целом литературный обзор охватывает необходимый и достаточный для понимания проблемы круг вопросов, хотя анализ известных возможностей перестройки структуры молекулы белка при ее кодировании одним геном мог бы украсить этот раздел диссертации.

**Материалы и методы; Полученные результаты и их обсуждение** объединены в диссертации в раздел «**Экспериментальная часть**». Материалы и методы включают все использованные в работе методы, начиная от культивирования микроорганизмов, проходя через выявление дополнительных олигомерных изоформ малатдегидрогеназы, их выделение, изучение каталитических и регуляторных характеристик и завершая анализом транскриптов гена исследуемого фермента. С точки зрения оппонента все необходимые методы описаны. Чтение данного раздела приводит к выводу о широком спектре используемых микробиологических, биохимических и молекулярно-биологических подходов, и свидетельствует о несомненно высоком уровне подготовленности диссертанта.

В разделе **Полученные результаты и их обсуждение** последовательно излагается ход проводимых исследований, начиная со сравнения роста галоалкалофильных микроорганизмов *Rh. steppense* в фотогетеротрофных и хемогетеротрофных условиях.

Выбор условий для исследований оказался очень удачным и позволил выявить определенные изменения в изоферментном составе малатдегидрогеназы из бактерий *Rh. steppense* при аэробном хемотрофном типе культивирования.

Подобранные модельные условия активно использованы в дальнейших сравнительных исследованиях и показано появление новых индуцибельных олигомерных форм малатдегидрогеназной системы, что автор связывает с изменениями направленности метаболизма. Каталитическая активность фермента в модельных условиях возрастает, при этом увеличивается и уровень транскриптов гена, кодирующего малатдегидрогеназу.

Результаты диссертационной работы представлены понятно, с достаточной степенью подробности и логично направлены на достижение поставленной цели. Полученные результаты являются **достоверными**. Обсуждение приведено одновременно с описанием результатов и выглядит логично. В качестве вывода из анализа результатов и литературных данных автор предлагает гипотетическую схему изменения углеродного метаболизма и функционирования малатдегидрогеназной ферментной системы при разных типах питания: переходе культур от анаэробного фототрофного роста к аэробному хемотрофному.

Хотелось бы сделать следующие замечания:

1. Если в фотогетеротрофных условиях с использованием только ацетата ИЦЛ активность не проявляется, значит есть другие анаплеротические последовательности, позволяющие ЦТК восполнять пул ЩУК. Автор почему-то не акцентирует на этом внимания. К сожалению, автор не уточнил источник углерода и используемую интенсивность света при фотогетеротрофном типе питания, что может оказаться существенным при экспрессии ИЦЛ.
2. В экспериментах с итаконатом автор убедительно показывает исчезновение МДГЗ с подавлением ИЦЛ итаконатом. Если при этом культуры способны расти, значит в данных условиях ИЦЛ и МДГЗ не являются жизненно необходимыми. Интересно было бы оценить скорость роста культур в присутствии итаконата и без него, это могло бы дать ответ, насколько мощными являются анаплеротические последовательности, замещающие ИЦЛ.
3. Предложенная гипотетическая схема не является единственно возможной. Имеются также и некоторые неточности:

1. В тексте автор упоминает пурпурные бактерии, принадлежащие к разным родам. При этом все роды имеют одно и то же сокращение: *Rh.* Однако *Rhodobacter*, *Rhjdspirillum* и *Rubrivivax* это все же разные роды, и их следовало бы сокращать разными обозначениями. Или же использовать принятую в зарубежной литературе трехбуквенную аббревиатуру.
2. Стр 74 и 75 содержит абзац в двух копиях.
3. Рис. 50 дублирует таблицу 4, а рис 51 дублирует табл. 5.

Сделанные замечания и имеющиеся неточности не имеют принципиального значения для положительной оценки диссертационной работы.

**Выводы** вытекают из полученных результатов и являются обоснованными.

**Список цитированной литературы** оформлен единообразно и аккуратно. Разумное использование обзоров и монографий в качестве цитируемой литературы позволило создать компактный список используемых источников.

Все результаты работы **опубликованы** в статьях в ведущих российских и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК РФ и были представлены на всероссийских и международных конференциях. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Диссертация хорошо проиллюстрирована, изложена четко и логично. Схемы, таблицы, рисунки занимают на ее страницах соответствующее место, согласующееся с излагаемым текстом. Судя по автореферату и диссертации, **автор внес определяющий вклад** в постановку задачи, разработку и проведение экспериментов и написание диссертации.

Диссертационная работа Лященко Майи Сергеевны представляет собой **завершенную** научно-исследовательскую работу.

Таким образом, диссертация Лященко Майи Сергеевны «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» на соискание ученой степени кандидата наук является научно-квалификационной работой, в которой представлены результаты по изучению взаимодействия цикла Кребса и глиоксилатного цикла при разных типах питания и соответствует критериям п.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 28.08.2017). Автор диссертационной работы Лященко Майи Сергеевны заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Зав. лабораторией биотехнологии и физиологии фототрофных организмов  
Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук,  
доктор биологических наук (научная специальность 03.02.03 – Микробиология)

Цыганков Анатолий Анатольевич

29. мая. 2018г.

Цыганков Анатолий Анатольевич:

Место работы: ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук.

Должность: заведующий лабораторией

Адрес: 142290, Институтская, 2, г. Пущино Московской обл.

e-mail: ttt-00@mail.ru

тел.: +7 (4967) 73-18-68



Подпись Цыганков А.А.  
Зав. канцелярией  
Института фундаментальных проблем биологии  
Российской академии наук