

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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

Диссертационная работа 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» является актуальной. Она посвящена изучению регуляции метаболических процессов в клетках живых организмов, что является одним 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. Одну из ключевых ролей, в сложном механизме протекания процессов адаптации, играет малатдегидрогеназный комплекс (МДГ, КФ 1.1.1.37), представленный изоферментами с различной субклеточной локализацией, принимающими участие в процессах клеточного дыхания, ЦТК, глиоксилатного и цитрат-малатного циклов, в компенсации стрессов различной природы.

Диссертантом показано, что при переходе с фототрофного анаэробного роста (МДГ представлена одной изоформой) на хемотрофный, в присутствии кислорода, происходит переключение метаболических потоков и индуцируются две дополнительные молекулярные формы малатдегидрогеназы. Изоформы представляют собой димер (МДГ3), тетрамер (МДГ2) и октамер (МДГ1) состоящие из гомологичных субъединиц с  $M_r = 35.06$  кДа. Молекулярно-биологическими методами доказано, что молекулярные формы фермента кодируются единственным геном *mdh* в геномной ДНК *Rh. steppense* и являются изоформами, образующимися в результате посттрансляционной модификации путем олигомеризации одинаковых субъединиц. Автором исследованы каталитические характеристики изоформ малатдегидрогеназы и установлена функциональная роль при смене типа питания *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.

Диссертация Лященко изложена на 145 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, методы, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы (223 источника). Иллюстрационный материал представлен в виде 5 таблиц и 62 рисунков.

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

Литературный обзор составлен с использованием современных источников. В Литературном обзоре приводится описание особенностей метаболизма фототрофных пурпурных бактерий, приведено подробное описание *Rhodovulum steppense*. Автор подробно проанализировал физиологическую значимость, механизм функционирования и регуляции, а также строение малатдегидрогеназной ферментной системы, представленные в научной литературе. В обзоре приведен значительный материал по гидратной оболочке малатдегидрогеназы, однако, на мой взгляд, он не имеет к исследованиям никакого отношения, судя по представленным в диссертации данным. Это перегружает литературный обзор. На стр. 24 представлена фраза «Малатдегидрогеназа является высокоэффективным и сильным растворителем для склонных к агрегации гетерологичных белков...». Фермент не может быть растворителем для белка. Не надо наполнять обзор теми фактами, в которых вы не разобрались. Это же относится к утверждению, что МДГ является перспективным ферментом для иммуноанализа (Стр 22-23). В целом литературный обзор немного перегружен информацией. Можно было сосредоточиться только на моментах более близких к материалу диссертации. Это же касается использования литературных данных в обсуждении результатов. Для каждого полученного результата приводится большой сравнительный массив данных из литературы в виде перечислений. Эти факты можно было оформить в виде сравнительной таблицы, что было бы гораздо удобнее для использования и восприятия материала. Кроме того, это хорошо бы проиллюстрировало вклад диссертанта в общую копилку знаний по данной теме.

Во 2-й главе подробно описаны методы исследования. Необходимо подчеркнуть, что для выполнения исследования автор диссертации использовал широкий спектр современных методов. Исследование функционирования малатдегидрогеназной системы

проводилось на представителях аноксигенных фототрофных бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s<sup>T</sup>. Автор постоянно упоминает о том, что это галоалкалофильные микроорганизмы, однако, приведенная среда культивирования бактерий, на которой происходил рост, противоречит этому положению. Среда является слабоминерализованной и не щелочной, что также противоречит природным условиям обитания исследуемого микроорганизма. Данный факт может повлиять на корректность исследований и сделанных выводов. Кроме того автор практически не описывает режимы культивирования, что затрудняет адекватную оценку и интерпретацию результатов.

В методах очистки МДГ (пункт 2.2.2.1) имеются нестыковки: «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». Элюция линейным градиентом или ступенчатым? Почему концентрация десорбции МДГ1 ниже концентрации самого градиента? Это как-то контролировалось?

Названия солей написаны небрежно. Начинается название словом заканчивается символом. Наилучший вариант обозначать все соли химическими формулами.

Проводить аналитическую гельфильтрацию на колонке 2x35 см с сефадексом G-200 не корректно, адекватный результат в данных условиях получить невозможно.

На страницах 74 и 75 повтор текста.

На странице 75 фраза «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)» не совсем понятно, что здесь имел виду автор и что хотел обсудить, тем более, что в цитируемой статье основной упор идет на структурные основы термостабильности МДГ. Материал ссылки уместен при обсуждении термостабильности исследуемых изоформ.

На странице 76 п.2.2.3. фраза «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». Может быть, имелось в виду общих для всех трех изоформ? В этом случае удобнее говорить об их идентичности. Тем более что приведенные масс-спектры не дают убедительной картины гомологичности. В качестве дополнительного

доказательства необходимо было привести последовательности выбранных пептидов из так называемого «score», а также подтверждение отношения их к малатдегидрогеназам из баз данных.

Дублирование результатов - таблица 4 и рисунок 50, а также таблица 5 и рисунок 51.

В Заключении фраза: «Показано, что присутствие октамерной, тетрамерной и димерной МДГ, состоящих из идентичных субъединиц, но отличающихся величинами молекулярных масс нативных полипептидов...» лишена здравого смысла.

В заключении хотелось бы узнать мнение диссертанта о том, каким образом происходит регуляция исследованных процессов в естественных условиях обитания микроорганизма, ведь смена светового и темнового периодов происходят в более короткие временные промежутки, чем показано в проведенных экспериментах.

Поставленные автором задачи выполнены полностью, а сама диссертация удовлетворяет требованиям к квалификационным работам.

Автором опубликованы в научных изданиях 12 статей и тезисов, 4 из которых опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК РФ, т.е. представлены широкому слою специалистов, занимающихся аналогичными исследованиями. Приведенные в работе выводы корректно отражают полученные автором научные результаты.

Автореферат полностью соответствует материалам диссертационной работы.

Таким образом, по актуальности проведенного исследования, новизне полученных результатов, методическому уровню и адекватности используемых экспериментальных подходов 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», полностью соответствует требованиям п.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013г. №842, предъявляемым к работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а сам автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Старший научный сотрудник  
лаборатории «Молекулярной инженерии»  
ФГУ «Федеральный исследовательский  
центр «Фундаментальные основы



биотехнологии» Российской академии  
наук» Институт биохимии имени А.Н. Баха  
119071 Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2  
Рабочий телефон: +7 (495)954-40-08  
Адрес электронной почты: a\_antipov@hotmail.ru

Кандидат биологических наук

Антипов А.Н.

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

Орловский А.Ф.

« 25 » мая 2018г.

