

УТВЕРЖДАЮ
Проректор – начальник
Управления научной политики
и организации научных исследований
МГУ имени М.В.Ломоносова,
А.А.Федянин



05 2018 года

Отзыв

ведущей организации 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 к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Актуальность темы диссертации.

Аноксигенные фототрофные пурпурные несерные бактерии *Rhodovulum steppense*, выделенные из мелководных степных содовых озер Центральной Азии, способны развиваться и функционировать в щелочных условиях при высоких концентрациях солей. Такие солеустойчивые организмы обладают особой биологической уникальностью, связанной с разнообразием адаптационных механизмов приспособления к стрессовым воздействиям среды, характеризующейся высоким уровнем солености. Особый интерес у галоалкалофильных представляют модификации в структуре белков, которые позволяют им функционировать при высокой концентрации соли. Важнейший фермент метаболизма – малатдегидрогеназа, помимо участия в процессах клеточного дыхания, в цикле трикарбоновых кислот и глиоксилатном цикле, способен играть важную роль в компенсации различных метаболических стрессов, возникающих в экстремальных условиях жизнедеятельности организма. Данная работа является продолжением цикла работ, проводимых в Воронежском государственном университете. В этих исследованиях показано, что малатдегидрогеназа многих микроорганизмов, включая серобактерии рода *Beggiatoa* и термофильных бактерий *Vulcanithermus medioatlanticus*, является ключевым ферментом, через который осуществляется регуляция потоков углерода в цикле трикарбоновых кислот и глиоксилатном шунте при изменении условий культивирования. Важнейшим фактором регуляции является изменение мультимерности малатдегидрогеназы, влекущее за собой изменение её каталитических и кинетических свойств. Малатдегидрогеназа и её свойства

достаточно подробно исследованы у эукариот, однако в литературе мало информации об особенностях её структуры, функционирования, образования множественных молекулярных форм у прокариотических организмов. Проведенное исследование является актуальным, и его основной целью было установление и изучение явления регуляции метаболизма бактерий в мире прокариот путем изменения мультимерности малатдегидрогеназы и общих принципов регуляции с использованием данного механизма.

Структура диссертации. Работа представлена в традиционной форме и содержит следующие разделы: «введение», «обзор литературы», «материалы и методы», «результаты и их обсуждение», «заключение», «выводы» и «список используемой литературы» по теме диссертации. В качестве иллюстраций работа включает 62 рисунка и 5 таблиц. Объем диссертации 145 страниц.

Обзор литературы представляет собой критическое обобщение результатов 223 работ отечественных и зарубежных авторов, включая самые свежие работы 2017 года. Обзор написан хорошим литературным языком и богато иллюстрирован схемами и рисунками. Он дает достаточно полное представление о состоянии современных исследований структуры центрального углеродного метаболизма. Анализ данных научной литературы приводит автора к заключению о недостаточной изученности некоторых вопросов, связанных с функционированием и регуляцией ферментов цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного шунта при изменении условий культивирования бактерий, и, таким образом, обосновывает постановку автором диссертации собственных экспериментальных исследований.

Научная новизна и степень обоснованности выводов и рекомендаций диссертации. Основная цель, которая поставлена в работе Лященко Майи Сергеевны, заключалась в изучении физико-химических, регуляторных и кинетических характеристик малатдегидрогеназы галоалкалофильных пурпурных несерных бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s, а также функций малатдегидрогеназы в различных условиях культивирования бактерии. Для решения этих задач автор выстроил логически стройную последовательность экспериментальных подходов. В ходе многостадийной очистки получены в электрофоретически гомогенном состоянии препараты малатдегидрогеназы в димерной, тетрамерной и октамерной формах. На гомогенных препаратах определены молекулярная масса фермента, константа Михаэлиса, изучено действие ионов металлов, влияние температуры и термостабильность МДГ. Методом Ds-Na-электрофореза выявлено димерное строение фермента. В отсутствие полного генома *Rhodovulum steppense* авторы провели молекулярно-биологические исследования структуры гена малатдегидрогеназы. С использованием этих данных был проведен анализ экспрессии гена малатдегидрогеназы, результаты которого вполне согласуются с данными энзиматического анализа при выращивании культур в разных условиях. Таким образом, при

выполнении исследований использованы адекватные и вполне современные методы энзиматических и молекулярно-биологических исследований.

Малатдегидрогеназа в бесклеточных экстрактах *Rhodovulum steppense*, выращенная в анаэробных условиях на свету, представлена в тетрамерной форме, в то время как при росте в аэробных хемотрофных условиях представлена тремя формами: октамерной, тетрамерной и димерной. Кроме того, на основе ингибиторного анализа с использованием итаконата – специфичного конкурентного ингибитора изоцитратлиазы – ключевого фермента глиоксилатного шунта были сделаны предположения о участии различных изоформ малатдегидрогеназы в метаболизме *Rhodovulum steppense*. В аэробных хемотрофных условиях окислительного стресса тетрамерная форма малатдегидрогеназы обеспечивает функционирование ЦТК, а димерная – глиоксилатного цикла.

Таким образом, суммируя сказанное выше, можно утверждать, что, поставленные автором задачи полностью реализованы. Представленные данные позволяют утверждать, что изменения мультимерности малатдегидрогеназы являются новым механизмом регуляции её активности в ответ на изменения условий культивирования.

Научно-практическое значение работы.

Полученные данные о физико-химических, регуляторных и кинетических характеристиках малатдегидрогеназы галоалкалофильных пурпурных несерных бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s, а также функциях малатдегидрогеназы в различных условиях культивирования бактерии существенно расширяют наши представления о механизмах регуляции энергетического и центрального углеродного метаболизма бактерий при изменении условий их культивирования. Результаты этих исследований можно использовать для создания математических моделей углеродного метаболизма, что позволит прогнозировать влияние различных факторов внешней среды на рост бактерий и направление потоков углерода в метаболизме прокариот, относящихся к различным таксономическим группам.

Замечания по работе. Анализ литературы, представленной в диссертации, и предпринятый мной анализ зарубежной литературы, выявил отсутствие данных о способности к пост-трансляционной регуляции путем изменения мультимерности малатдегидрогеназы бактерий в ответ на изменение условий культивирования. Это дает основание авторам утверждать, что они имеют приоритет в открытии нового способа пост-трансляционной регуляции малатдегидрогеназы бактерий. В диссертации такого вывода не имеется. Ранее было известно лишь о ацетилировании молекулы малатдегидрогеназы как о способе регуляции её активности. Другие замечания. В диссертации, также, как и в автореферате недостаточно полно изложена методика культивирования бактерий. Для культивирования в аэробных условиях приводится только состав среды, но отсутствуют условия культивирования (в качалочных колбах, на роторном шейкере, число

оборотов или иной способ). Для культивирования бактерий в фототрофных условиях описание условий культивирования полностью отсутствует. Остальные замечания носят в основном технический характер. В списке литературы источники как правило ранжируются по авторам. В диссертации этот принцип часто нарушается. Эти погрешности могут быть легко устранены, и не влияют на общую оценку диссертации.

Заключение. При выполнении диссертационной работы автором использованы современные микробиологические, биохимические и биоинформационные методы исследования, а полученные результаты характеризуются высокой степенью достоверности. Выводы подтверждены убедительным экспериментальным материалом. Основные результаты опубликованы в статьях в ведущих российских журналах, рекомендованных ВАК РФ, и представлены на российских и международных научных конференциях. Автореферат отражает основное содержание диссертации.

Материалы диссертации рекомендуется включить в учебные курсы по микробиологии и биохимии микроорганизмов.

По актуальности, новизне, фундаментально-научной и практической значимости результатов 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 законченной научно-квалификационной работой.

Работа 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), а ее автор, Лященко Майя Сергеевна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, протокол № 6 от «27» апреля 2018 г.

Главный научный сотрудник
биологического факультета МГУ
им. М.В. Ломоносова
Доктор биологических наук, профессор

Ивановский Р.Н.

119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова». Биологический факультет
Телефон: (495) 734-04-26
E-mail: mguru@mail.ru

Заведующий кафедрой микробиологии
Доктор биологических наук, профессор



Нетрусов А.И.

Подпись Ивановского Р.Н. и
Нетрусова А.И. завершено