



18

**Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)**  
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки**  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*  
*Российской академии наук*  
**(ИБХ РАН)**

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика  
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru), [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)  
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

08.12.14 № 08-2171-31

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

### ОТЗЫВ

**официального оппонента Рогожина Е.А. на диссертационную работу Трубицина Ивана Васильевича по теме: «Диссимиляционная нитратредукция у представителей серобактерий рода *Thiothrix*: очистка и характеристика расpirаторной нитратредуктазы, скрининг генов, участвующих в процессах денитрификации», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».**

Процесс анаэробного дыхания на нитратах был широко распространен среди микроорганизмов древней Земли еще до появления в атмосфере свободного кислорода. Впоследствии, аэробное дыхание стало доминирующим типом, однако немало микроорганизмов сохранили способность к дыханию на нитратах, которые выполняют роль терминального акцептора электронов в электронтранспортной цепи. На сегодняшний день помимо облигатных аэробов существует немало организмов – факультативных анаэробов, сохранивших способность к анаэробному дыханию в случае создания соответствующих условий в окружающей среде. Бесцветные серобактерии занимают водные экологические ниши, где устанавливаются динамические градиенты молекулярного кислорода, или он отсутствует. Подавляющее большинство

бесцветных серобактерий принадлежит к аэробам, но, оказавшись в микроаэробных или анаэробных условиях, эти организмы испытывают кислородный стресс, при котором индуцируются альтернативные дыхательные системы.

Для представителей серобактерий рода *Thiothrix* способность к анаэробному дыханию в присутствии нитратов ранее не была показана. Однако возможность этого процесса не исключена, так как местообитание представителей рода *Thiothrix* характеризуется регулярным суточным ритмом смены аэробно-анаэробного режима в приливно-отливной зоне морской литорали или в проточных водных экосистемах с высоким содержанием сульфида. Процесс смены аэробного типа дыхания на анаэробный в этом случае будет иметь глубокий экологический адаптационный смысл. В связи с этим особого внимания заслуживает процесс анаэробного дыхания - денитрификации, в котором активность ферментов, участвующих в восстановлении нитратов до газообразных продуктов, индуцируется в анаэробных условиях, т.е. в условиях стресса, которым часто подвергаются прокариоты в сероводородных биотопах. Несмотря на широкий спектр прокариот, способных к анаэробному дыханию в присутствии нитратов, данных по изучению свойств респираторных нитратредуктаз, катализирующих начальную реакцию денитрификации, недостаточно вследствие трудности работы с ними. Так, для представителей рода *Thiothrix*, которые, в соответствии с результатами недавних исследований, способны к анаэробному дыханию на нитратах, каких-либо данных об очистке респираторной нитратредуктазы нет ни в отечественной, ни в зарубежной литературе. В этой связи актуальность темы диссертационной работы Трубицина И.В. не вызывает сомнений.

По своей структуре и объему диссертация состоит из 8 разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, полученные результаты, обсуждение результатов, выводы, список литературы, приложение. Работа изложена на 134 страницах, содержит 14 таблиц и 47 рисунков. Библиографический указатель

содержит 155 источник литературы. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, входящих в список ВАК.

Рассмотрим более подробно содержание глав.

В Главе 1 «Обзор литературы» приводится подробное описание процесса денитрификации с определением значения данного процесса, приводится понятия «полная» и «усеченная» денитрификация, обнаруженная у прокариот различных физиологических групп; приводятся схема путем восстановления нитрата до газообразного азота с указанием биохимических процессов, задействованных ферментов и промежуточных соединений. Отдельно дается характеристика ферментного комплекса, участвующего в процессе денитрификации в цитоплазматическом и периплазматическом пространствах. Кроме того, в данной главе приводятся данные по распространенности различных типов нитратредуктаз у широкого спектра видов прокариот, а также локализация некоторых генов азотного метаболизма у прокариот на примере видов из родов *Pseudomonas* и *Paracoccus*. При описании процесса нитратного дыхания отдельно и достаточно детально приводится характеристика и классификация нитратредуктаз прокариот (ассимиляционных и диссимиляционных, в том числе мембраносвязанных респираторных и периплазматических), приводится ряд их структурных особенностей, таких как наличие вспомогательных реакционных боковых групп аминокислотных остатков, устройств активных центра у представителей различных семейств данного типа ферментов. Отдельное внимание в главе уделено описанию структурно-функциональных особенностей диссимиляционных нитратредуктаз, в частности, мембраносвязывающих нитратредуктаз NarGHJ – их пространственных структур и физиологической роли, физико-химических параметров (молекулярная масса, рН и температурные оптимумы, термостабильность и константа Михаэлиса) ферментов различных видов прокариот, а также механизма транспорта нитратов в цитоплазму из периплазматического пространства. Более того, в соответствии с одной из

M

заявленных в работе задач приводятся достаточно подробные данные по химическим ингибиторам данных ферментов, количественные значения по  $IK_{50}$  и  $K_i$ . Также приведена краткая информация о других ферментах, участвующих в клеточном азотном обмене (нитритредуктазы, NO- и  $N_2O$ -редуктазы).

Последний раздел обзора литературы посвящен детальной характеристике исследуемого рода *Thiothrix*, морфологическим параметрам видов данного рода, их таксономическому составу и филогенетическому положению, а также экологическим аспектам обитания. На основе проведенного анализа литературных данных диссертант достаточно убедительно формулирует цель и задачи исследования, которые включают в себя выявление и изучение процесса анаэробного дыхания у представителей серобактерий рода *Thiothrix*, очистка и характеристика ключевого фермента диссимиляционной нитратредукции – респираторной нитратредуктазы. Причем автор отмечает, что для представителей серобактерий рода *Thiothrix*, считавшихся ранее облигатными аэробами, впервые показана возможность анаэробного дыхания в присутствии нитратов в качестве терминального акцептора электронов. Процесс смены аэробного типа дыхания на анаэробный имеет глубокий экологический адаптационный смысл.

Глава 2 «Методы исследований» содержит достаточно подробные протоколы основных используемых методов исследования, а также перечень и реактивов, применявшихся в работе.

Глава 3 «Результаты и их обсуждение» представляет собой логичное изложение хода работы. В первом разделе этой главы диссертант приводит данные по уровню анаэробного роста и динамике восстановления нитратов и образования нитритов при анаэробном дыхании на нитратах у представителей серобактерий рода *Thiothrix* (максимальный уровень содержания белка, количество окисленных форм нитратов и образованных форм нитритов), а также временную динамику зависимости между увеличением концентрации нитритов и уменьшением содержания нитратов и тиосульфата натрия. Также

92

дополнительно была определена активность нитратредуктазы у различных видов рода *Thiothrix* при культивировании в аэробных и анаэробных условиях.

Достаточно большой раздел в главе посвящен очистке и характеристике респираторной нитратредуктазы из *T. lacustris* AS. Для выделения данного фермента в активном состоянии была применена методика фракционирования, состоящая из четырехстадийного выделения на основе комбинации методов жидкостной хроматографии низкого давления (гель-эксклюзионной и анионообменной) и ПААГ-электрофореза. Для контроля наличия активного фермента на каждой стадии очистки проводили измерение его общей и удельной активности, а также определяли содержание общего белка и рассчитывали итоговый выход. В результате автору удалось получить целевой фермент с сохранением ферментативной активности довольно высокой степени очистки, что позволило в дальнейшем ряд его молекулярных свойств (молекулярная масса, субъединичный состав, рН и температурный оптимум, кинетические характеристики). Кроме того, отдельным аспектом в данном разделе являлось исследование влияния химических ингибиторов (фенантролин, ЭДТА, диэтилдитиокарбамид натрия, азид натрия и бета-меркаптоэтанол) на уровень активности изучаемого белка в зависимости от их концентрации.

На основе данных о наличии нитратредуктазы была проведена работа по идентификации генов семейства *narG*, кодирующих данный фермент, у различных представителей рода *Thiothrix*, установлена разница в степени его экспрессии у вида *T. lacustris* на количественном и качественно уровне в зависимости от условий культивирования. Установлено, что при анаэробном росте в клетке присутствует большое количество транскрипта *narG*, тогда как при росте в аэробных условиях он не выявлен вообще.

Отдельно в рамках данного исследования автором был проведен скрининг функциональных генов у видов исследуемого рода, участвующих в диссимиляционных процессах восстановления нитритов, закиси и окиси азота (кодирующих нитритредуктазу, NO- и N<sub>2</sub>O-редуктазу). Завершается данная

глава заключением автора на тему поиска связи между экологическими наблюдениями и данных молекулярно-биологических исследований представителей рода *Thiothrix*, в которых происходит сравнение таких параметров как место и условий обитания (выделения) штаммов трех видов данного рода, характеристика процесса анаэробного дыхания и наличие генов нитратредукции.

Глава 4 «Обсуждение результатов» посвящена преимущественно двум аспектам данной работы – обоснованию предложенной схемы выделения респираторной нитратредуктазы в индивидуальном состоянии с обоснованием выбора каждой стадии и указанием ее преимуществ и недостатков, а также особенностям диссимиляционной нитратредукции у видов рода *Thiothrix*.

В конечном итоге на основании вышеизложенного можно утверждать, что представленная диссертационная работа Трубицина И.В. обладает неоспоримой актуальностью, научной и практической значимостью полученных результатов.

К некоторым замечаниям по рассматриваемой диссертационной работе можно отнести следующие:

1. Раздел 1.4.3. "Особенности структурной организации" (стр. 37) - автор приводит описание структуры комплекса NarGH диссимиляционной нитратредуктазы с характеристикой отдельных доменов и субъединиц. При этом приведена ссылка на работу 1997 года. Было бы желательно при написании данного раздела литературного обзора использовать более свежие данные, например по пространственной структуре гомолога из *E. coli*, нативную структуру которого, а также разнообразных мутантных форм, со ссылками на литературные источники можно найти в Protein Data Bank. Однако важно подчеркнуть, что данное замечание является больше рекомендацией.

2. Раздел 2.6. "Очистка и характеристика респираторной нитратредуктазы", подраздел 2.6.1. "Очистка фермента" (стр. 66) - не указаны размеры (в см или мм) колонки для гель-фильтрации, а также объем наносимого образца (в мл) и каким образом производили сбор фракций (вручную, с помощью

автоматического коллектора).

3. Тот же раздел (стр. 67) - по какой причине была использована система препаративного гель-электрофореза в градиенте концентраций 4-10% для кислых белков? Определялась ли  $pI$  для изучаемого фермента?

4. Тот же раздел (стр. 67) - насколько эффективно применение используемого в работе способа элюирования вещества из геля в раствор? Есть ли ссылка на экспериментальную работу? Наиболее эффективным методом является перенос белка на PVDF мембрану под действием электрического тока, что позволяет существенно снизить потери и сохранить номинальную чистоту вещества.

5. Таблица 9. «Таблица очистки респираторной нитратредуктазы» (стр. 75) – название таблицы формулируется некорректно, правильнее было бы в нем указать «значения физико-химических параметров и функциональной активности респираторной нитратредуктазы на каждой стадии фракционирования». По названиям столбцов в таблице: как именно определялся общий объем в мл? До проведения очистки или после? А также, какое количество раз повторяли каждую стадию очистки? Например, на указанную колонку для ГФХ невозможно сразу нанести объем образца, равный 18 мл, также остается неясным каким образом был получен объем обогащенного фермента после препаративного ПААГ-электрофореза в 21 мл?

6. Рисунок 39 «Электрофорез в агарозном геле (1,2%) продуктов ПЦР-амплификации...» (стр. 91) – маркер ДНК на геле приведен в середине, обычно его целесообразно размещать с краю, справа или слева от вариантов.

7. Фраза «Термостабильность нитратредуктазы была определена ранее на частично очищенном препарате» (стр. 107) - поясните данное утверждение а аспекте данных по термостабильности исследуемой нитратредуктазы, приведенных в главе 3 диссертации.

8. Что значит фраза «...при использовании электрофореза удалось снизить общий объем белка в 11-12 раз.» (стр. 107)?

25

Следует подчеркнуть, что приведенные замечания не умаляют достоинства работы, которая в целом является законченным, профессиональным исследованием. Цель и задачи, поставленные в диссертации, решены. Получены интересные и перспективные результаты, достоверность которых подтверждается серией экспериментальных данных. Диссертация выполнена на достаточно высоком уровне и, несомненно, имеет важную теоретическую и практическую значимость. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации. Выводы полностью соответствуют приведенным результатам исследований.

Диссертационная работа Трубицина Ивана Васильевича отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно Постановлению Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. N 842. Ее автор, Трубицин Иван Васильевич вполне заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Рогожин Евгений Александрович,  
младший научный сотрудник лаборатории  
нейрорецепторов и нейрорегуляторов  
ИБХ РАН, кандидат химических наук

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

Телефон: +7-495-336-40-22

e-mail: [rea21@list.ru](mailto:rea21@list.ru)

