

официального оппонента на диссертацию Петушковой Екатерины Павловны «Ассимиляция ацетата пурпурной несерной бактерией *Rhodobacter capsulatus* B10», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология

Актуальность темы диссертации. У большинства бактерий ассимиляция ацетата осуществляется через цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). Многие C₄-кислоты ЦТК расходуются на биосинтетические нужды. Для восполнения этих потерь у большинства бактерий в систему реакций ЦТК включается глиоксилатный шунт. Глиоксилатный шунт представляет собой анаплеротическую последовательность реакций, результатом работы которых является синтез малата (интермедиата ЦТК) из ацетил-КоА и глиоксилата. Глиоксилатный шунт составляют два фермента - изоцитратлиаза, расщепляющая изоцитрат на глиоксилат и сукцинат, и малатсинтаза, осуществляющая конденсацию глиоксилата и ацетил-КоА. Однако существует большая группа микроорганизмов, относящихся к различным таксономическим группам, которые не имеют изоцитратлиазы, но, тем не менее, сохраняют способность расти на среде с ацетатом в качестве единственного источника углерода (так называемые ИЦЛ- бактерии). Примерами могут служить пурпурные несерные бактерии *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* и *Phaeospirillum fulvum*, бесцветные серные бактерии *Thiobacillus versutus* и некоторые метилотрофные бактерии с сериновым путем, например *Methylobacterium extorquens* AM1. Секвенирование полного генома пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* показало, что бактерия имеет гены изоцитратлиазы и малатсинтазы, однако литературные данные относительно функционирования этого пути в *Rba. capsulatus* противоречивы: наличие активности этих ферментов подтверждено рядом авторов, тогда как другими авторами активность не обнаружена. Таким образом, пути метаболизма ацетата *Rba. capsulatus* остаются неясными, в связи с чем актуальность темы исследования Петушковой Е.П. не вызывает сомнения.

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», «список опубликованных работ по теме диссертации». В качестве иллюстраций работа включает 21 рисунок и 11 таблиц.

Обзор литературы представляет собой критическое обобщение результатов 288 работ отечественных и зарубежных авторов, включая самые свежие работы 2016 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 включая все возможные анаплеротические системы, которые практически и теоретически могут принимать участие в восполнении пула промежуточных субстратов ЦТК, расходуемых на биосинтетические нужды клеток. Анализ данных научной литературы приводит автора к заключению о недостаточной изученности некоторых вопросов, связанных с функционированием ЦТК в

отсутствии глиоксилатного шунта, 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 Петушковой Е.П., заключалась в изучении особенностей ассимиляции ацетата пурпурной несерной бактерией *Rba. capsulatus* штамм В10, как через глиоксилатный шунт, так и альтернативные пути восполнения пула щавелевоуксусной кислоты в ЦТК. Для решения этой задачи автор выстроил логически стройную последовательность экспериментальных подходов. Показано, что изоцитратлиаза в бесклеточных экстрактах *Rba. capsulatus* В10 подвержена протеолизу, который можно предотвратить добавлением ингибиторов протеаз. Это обстоятельство не учитывалось в ранних работах, что приводило к неоднозначным заключениям о наличии глиоксилатного шунта у *Rba. capsulatus*. Рекомендация по использованию ингибиторов протеаз будет полезна при исследовании активности ферментов, как в данном организме, так и у других бактерий. Результаты этих исследований однозначно показали, что гены глиоксилатного цикла не только присутствуют в геноме *Rba. capsulatus* но и экспрессируются в процессе фототрофного роста на среде с ацетатом. Кроме того, показано, что синтез изоцитратлиазы – ключевого фермента глиоксилатного цикла является объектом жесткой регуляции. При росте *Rba. capsulatus* на среде с лактатом фермент не синтезируется, его активность проявляется через несколько часов после перехода на рост в присутствии ацетата в качестве единственного источника углерода. При исчерпании ацетата в среде происходит резкое снижение активности изоцитратлиазы в клетках.

Вместе с этим, автором были выявлены условия, когда исследуемая бактерия способна к фотоассимиляции ацетата без участия глиоксилатного шунта. Показано, что изоцитратлиаза не синтезируется в клетках *Rba. capsulatus* при смене ростового субстрата с лактата на ацетат в том случае, когда инокуят перед посевом на среду с ацетатом находился в стационарной фазе роста более 5 часов. Установлено, что рост таких культур без активной изоцитратлиазы нельзя объяснить использованием накопленных клеткой углеводов. Таким образом, автор пришел к логичному заключению, что у *Rba. capsulatus* имеются альтернативные глиоксилатному циклу пути восполнения ЦТК C₄-кислотами.

С использованием данных биоинформационного анализа впервые создана универсальная метаболическая карта всех возможных анаэробных путей восполнения пула щавелевоуксусной кислоты в ЦТК у прокариот. Используя базу данных NCBI Gene Expression Omnibus, содержащую результаты транскриптомных анализов, показано, что при фототрофном росте на среде с ацетатом в анаэробных условиях у *Rba. capsulatus* синтезируются транскрипты всех генов глиоксилатного цикла, цикла Кальвина-Бенсона, пути преобразования пирувата/ФЕП C₃-карбоксилирующими ферментами, этилмалонил-КоА пути и пути образования глиоксилата при участии рибулозобисфосфат карбоксилазы в качестве оксигеназы.

Таким образом, суммируя сказанное выше, можно утверждать, что, поставленные автором задачи полностью реализованы.

Научно-практическое значение работы. Метаболическая схема путей восполнения пула интермедиатов ЦТК при росте с использованием ацетата создана без связи с метаболизмом какого-то конкретного прокариотического организма, поэтому, в

совокупности с данными о ферментах-аналогах (представлены в тексте и таблицах), может служить первичной информацией для изучения метаболизма ацетата у представителей микроорганизмов различных систематических групп.

Полученные данные о метаболических путях, гены для реализации которых присутствуют у *Rba. capsulatus*, существенно дополняют имеющиеся метаболические схемы ассимиляции ацетата этой бактерии. Их можно использовать для создания математических потоковых моделей анаэробного метаболизма, что позволит прогнозировать влияние различных факторов внешней среды на рост и направление потоков в центральном углеродном метаболизме у бактерий *Rba. capsulatus*.

Замечания по работе в основном носят технический характер. Это отдельные опечатки и погрешности стиля изложения, которые могут быть легко устранены.

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 2 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 Петушковой Екатерины Павловны «Ассимиляция ацетата пурпурной несерной бактерией *Rhodobacter capsulatus* В10», являющаяся научно-квалификационной работой, полностью соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 30.07.2014), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Петушкова Екатерина Павловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Доктор биологических наук, профессор
главный научный сотрудник кафедры
микробиологии биологического ф-та
МГУ им. М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
тел.: 8(495) 93-94-203
E-mail: mguru@mail.ru,

Р.Н. Ивановский

17 декабря 2017 г.

ПОДПИСЬ Р.
ЗАВЕРЯЮ



Документовед

Ивановский Р.Н.