

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
Институт Биохимии им. А.Н. Баха

На правах рукописи

Васина Дарья Владимировна

ИЗУЧЕНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ МУЛЬТИГЕННОГО СЕМЕЙСТВА
ЛАККАЗ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *TRAMETES HIRSUTA* –
ЭФФЕКТИВНОГО ДЕСТРУКТОРА ЛИГНИНА

03.01.04. Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор
О.В. Королева

Москва – 2015

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. СЕМЕЙСТВО ПОЛИМЕДНЫХ ОКСИДАЗ В ЛИГНИНМОДИФИЦИРУЮЩЕМ КОМПЛЕКСЕ ГРИБОВ БЕЛОЙ ГНИЛИ.....	13
1.1.1. СТРУКТУРА СЕМЕЙСТВА ПОЛИМЕДНЫХ ОКСИДАЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ ..	14
1.1.2. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БАЗИДИАЛЬНЫХ ЛАККАЗ.....	18
1.1.3. РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ЛАККАЗ.....	24
1.2. СИНТЕЗ И ПРОЦЕССИНГ СЕКРЕТИРУЕМЫХ ЛАККАЗ.....	27
1.2.1. СИСТЕМЫ СЕКРЕЦИИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ	28
1.2.2. ФОРМИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ КОНФОРМАЦИИ ЛАККАЗ И ВСТРАИВАНИЕ ИОНОВ МЕДИ.....	32
1.2.3. ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ ЛАККАЗ	34
1.3. РОЛЬ БАЗИДИАЛЬНЫХ ЛАККАЗ В ПРОЦЕССАХ ЛИГНИНОЛИЗА И ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ГРИБОВ	37
1.3.1. ХАРАКТЕРИСТИКА БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ РОДА <i>TRAMETES</i>	37
1.3.2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ И КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛАККАЗ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ	39
1.3.3. СВЯЗЬ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ И БИОХИМИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ЛАККАЗ, КОДИРУЕМЫХ МУЛЬТИГЕННЫМ СЕМЕЙСТВОМ.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1. ШТАММ МИКРООРГАНИЗМА (ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ)	45
2.2. РЕАГЕНТЫ.....	45
2.3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАЗИДИОМИЦЕТА <i>T. HIRSUTA</i> НА СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА.....	46
2.3.1. ПРЕКУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМА.....	46
2.3.2. ЖИДКОФАЗНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА СИНТЕТИЧЕСКИХ СРЕДАХ	46
2.3.3. ЖИДКОФАЗНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОМ СУБСТРАТЕ	47
2.3.4. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ БИОМАССЫ В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>T. HIRSUTA</i>	47
2.4. ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕТОМА <i>T. HIRSUTA</i>	47

2.4.1.	ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ АКТИВНОСТЕЙ ФЕРМЕНТОВ ЛИГНИНМОДИФИЦИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА <i>T.HIRSUTA</i>	47
2.4.2.	ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
2.4.3.	ДВУМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ (2-DE) БЕЛКОВ.....	50
2.4.4.	МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ	50
2.5.	ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОМА <i>T. HIRSUTA</i>	51
2.5.1.	ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
2.6.	ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМА <i>T. HIRSUTA</i>	52
2.6.1.	ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (СУММАРНОЙ РНК)	52
2.6.2.	СИНТЕЗ ПЕРВОЙ ЦЕПИ КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ ДНК (КДНК) НА РНК-МАТРИЦЕ.....	52
2.6.3.	ВЫЧИТАНИЕ БИБЛИОТЕК КДНК	53
2.6.4.	ЗЕРКАЛЬНО-ОРИЕНТИРОВАННАЯ СЕЛЕКЦИЯ ОБРАЗЦОВ КДНК	55
2.6.5.	ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ	57
2.6.6.	АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ СУПРЕССИОННОЙ ВЫЧИТАЮЩЕЙ ГИБРИДИЗАЦИИ КДНК	57
2.6.7.	ДИЗАЙН ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПЦР	57
2.6.8.	ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР	59
2.6.9.	ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ ЛАККАЗ <i>T.HIRSUTA</i>	59
2.6.10.	ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ	60
2.6.11.	БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЛАККАЗ	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ		62
3.1.	ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ <i>T. HIRSUTA</i> ПРОДУЦИРУЕМЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОМ НА СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА	62
3.1.2.	ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ <i>T. HIRSUTA</i> ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЕКРЕТОМА.....	66
3.1.3.	СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ <i>T. HIRSUTA</i> ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА	69
3.2.	ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЕЙ ПРОТЕОМА <i>T. HIRSUTA</i> , ИЗМЕНЯЮЩИХСЯ В ОТВЕТ НА ИНДУКЦИЮ ЛАККАЗ МЕДЬЮ И ПРИ РОСТЕ НА ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОМ СУБСТРАТЕ	79

3.2.1. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ МИЦЕЛИЯ <i>T. HIRSUTA</i> ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОМА.....	80
3.2.2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ <i>T. HIRSUTA</i> ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА	81
3.3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ ТОТАЛЬНЫХ ТРАНСКРИПТОМОВ В ОТВЕТ НА ВНЕСЕНИЕ ИОНОВ МЕДИ	88
3.3.1. СУПРЕССИОННАЯ ВЫЧИТАЮЩАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МУЛЬТИГЕННОГО СЕМЕЙСТВА ЛАККАЗ <i>T. HIRSUTA</i>	89
3.3.2. СЕКВЕНИРОВАНИЕ БИБЛИОТЕК КДНК И СБОРКА ТРАНСКРИПТОМОВ	92
3.3.3. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ SSH С ПОМОЩЬЮ ПО BLAST TO GO.....	93
3.4. ИССЛЕДОВАНИЕ МУЛЬТИГЕННОГО СЕМЕЙСТВА ЛАККАЗ <i>T. HIRSUTA</i>	100
3.4.1. <i>IN SILICO</i> СКРИНИНГ ГЕНОВ ЛАККАЗ В ТРАНСКРИПТОМЕ.....	100
3.4.2. АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЧЛЕНОВ МУЛЬТИГЕННОГО СЕМЕЙСТВА ЛАККАЗ <i>TRAMETES HIRSUTA</i>	103
3.4.3. КЛАСТЕРИЗАЦИЯ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА ЛАККАЗ <i>T. HIRSUTA</i> И ДРУГИХ ГРИБОВ РОДА <i>TRAMETES</i>	104
3.4.4. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ЛАККАЗ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА	111
3.4.5. ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОРОВ НА ПРОФИЛИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЛАККАЗ <i>T. HIRSUTA</i>	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	121
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБТС – 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин 6-сульфонат)
АГ - аппарат Гольджи
АФК – активные формы кислорода
ГП – глюкозо-пептонная среда
ИЭТ – изоэлектрическая точка белка
КЖ – культуральная жидкость
ЛМФ - лигнинмодифицирующие ферменты
ЛМС – лигнинмодифицирующая система
ЛЦ – лигноцеллюлозный субстрат
ПМО – полимедные оксидазы
ПЦР – полимеразная цепная реакция
СВ - секреторных везикул
СР – церато-платанины
ТФ - транскрипционные факторы
цАМФ - циклический аденозинмонофосфат
ЭПР - эндоплазматический ретикулум
ААО – арилалкоголь оксидаза
АОХ - альтернативная оксидаза
ARE – Цис-регуляторные элементы, связанные с окислительным стрессом
CHAPS - 3-(3-Холамидопропил) диметиламмоний-3-пропансульфонат
DMP – 2,6 – диметоксифенол
DTT - дитиотреитол
GLOX – глиоксальоксидаза
GO – геновая онтология
HSE – Цис-регуляторные элементы, реагирующие на белки теплового шока
Lac - лакказа
LiP – лигнин пероксидаза
MnP – марганец-зависимая пероксидаза
MOS – зеркально-ориентированная селекция кДНК
Mr – молекулярная масса белка
MRE – Цис-регуляторные элементы, реагирующие на ионы металлов
qPCR - количественная ПЦР в реальном времени
RACE - методика быстрой амплификации 5' и 3'-концов кДНК
RQ - относительный уровень экспрессии гена
SSH – супрессионная вычитающая гибридизация кДНК
VPs - марганец-независимая пероксидаза
XRE – Цис-регуляторные элементы, реагирующие на ксенобиотики

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и современное состояние исследований

Мицелиальные грибы обладают мощным потенциалом к разложению растительных, в том числе древесных субстратов, и тем самым являются необходимыми элементами углеродного цикла Земли, генерации гуминового составляющего почвы и формирования ее тонкой структуры. Дереворазрушающие грибы принадлежат к отделам Basidiomycota и Ascomycota, и уникальны по своей способности деградировать компоненты клеточных стенок ксилемы. Более того, способностью разлагать лигнин – одного из наиболее трудно деградируемого растительного биополимера, обладают в основном базидиомицеты – возбудители белой гнили древесины [1]. Деструкция древесных субстратов является комплексным процессом, эффективность которого определяется действием ферментативных систем грибов и напрямую зависит от их качественного и количественного состава. Известно, что некоторые виды грибов белой гнили также обладают уникальными механизмами детоксификации, как продуктов деградации лигнина, так и различных ксенобиотиков (в том числе красителей, гербицидов, пестицидов, полициклических ароматических углеводородов, диоксинов и пр.), поэтому постоянно проводятся работы по поиску, выделению и изучению новых штаммов базидиомицетов, перспективных для использования в технологиях биоконверсии и биоремедиации.

Процесс деструкции лигнина и различных ксенобиотиков грибами белой гнили состоит из большого количества стадий и его эффективность определяется уникальной лигнолитической системой, в состав которой входят: лакказы (КФ 1.10.3.2) и различные группы пероксидаз, в том числе марганец пероксидазы (КФ1.11.1.13) и лигнин пероксидазы (КФ 1.11.1.14), а также комплекс вторичных метаболитов, секретируемых этими грибами [2].

В настоящее время активно проводятся исследования физиологии, биохимии и генетики базидиальных грибов. Секвенировано и частично аннотировано более 40 геномов различных базидиомицетов. Полученные результаты предоставляют уникальную возможность для изучения биологии и эволюции видов, важных как с фундаментальной, так и прикладной точек зрения: во-первых, имеющиеся на настоящий момент информационные ресурсы в сочетании с экспериментальными данными, ускоряют исследование фундаментальных аспектов биологии базидиомицетов [3]; во-вторых, позволяют осуществить поиск и последующее получение целевых ферментов и биологически активных соединений грибов для использования в промышленной биотехнологии, экологии и медицине.

Сегодня благодаря интенсивному развитию биоинформационных ресурсов становится возможным детальный анализ транскриптомов, протеомов и секретомов высших грибов. На всех трёх уровнях изучаются как биохимические механизмы деградации различных типов древесины базидиомицетами, так и определяется спектр ферментов лигноцеллюлолитического комплекса, вовлеченных в эти процессы. Несмотря на выявленные общие закономерности процессов деструкции древесины, конкретный механизм определяется индивидуальными особенностями грибов, участвующих в данном процессе. Как показано, физиолого-биохимические свойства грибов обусловлены средой их обитания и составом мультиферментных комплексов, что, в свою очередь, связано с экологическими особенностями и трофической специализацией видов.

В последние годы реализовано несколько проектов по изучению базидиомицета *Phanerochaete chrysosporium* – модельного организма, осуществляющего разложение древесины по типу белой гнили, в том числе проведены работы по полногеномному секвенированию (WGS) *P. chrysosporium* [4], его протеомному и секретомному анализу [5–7], а так же исследования транскриптома при культивировании на различных модельных субстратах (например, целлюлозная масса [8] и дуб [9]). Кроме того, недавно были опубликованы данные полного секвенирования генома (WGS) и данные секвенирования транскриптома при культивировании на среде, содержащей целлюлозу, для первого базидиомицета-возбудителя бурой гнили древесины *Postia placenta* [10], опубликованы геномы грибов белой гнили - *Auricularia delicata*, *Dichomitus squalens*, *Fomitiporia mediterranea*, *Punctularia strigosozonata*, *Stereum hirsutum*, *Trametes versicolor* [11], а так же недереворазлагающего сапротрофа *Coprinopsis cinerea* [12] и базидиомицета-миккоризообразователя *Laccaria bicolor* [13]. Для них так же ведутся активные транскрипционные исследования. Во всех исследованных геномах базидиомицетов обнаружены мультигенные семейства, кодирующие ферменты лигноцеллюлолитического комплекса грибов, при этом показана их дифференциальная экспрессия в зависимости от условий культивирования и состава ростовых сред.

Все эти исследования позволили установить ряд особенностей ферментативной деградации древесины базидиомицетами, при этом выявили ряд неизвестных ранее белков, продуцируемых грибами, и предположительно участвующих в разрушении лигноцеллюлозного субстрата. При этом у базидиальных грибов наиболее изучена в этом процессе роль мультигенных семейств, кодирующих пероксидазы. Наименее изученными, с точки зрения регуляции экспрессии, биосинтеза, секреции, функциональных свойств и выполняемой биологической роли, являются мультигенные семейства, кодирующие лакказы у базидиомицетов.

Поскольку процесс разрушения лигноцеллюлозных субстратов грибами белой гнили является весьма сложным, что связано с широким кругом вовлеченных в него ферментов, для полного понимания биохимических механизмов регуляции процессов биотрансформации растительных и древесных субстратов грибами необходимы дальнейшие исследования, что, в свою очередь, облегчит поиск новых грибных штаммов и ферментов перспективных для использования в биотехнологических процессах. Кроме того, также недостаточно изучены метаболические пути и ферменты, вовлеченные в биосинтез базидиомицетами вторичных метаболитов, что диктует необходимость проведения дальнейших исследований для поиска, идентификации и характеристики новых биологически активных соединений грибов (таких как гормоны, антибиотики, гликопротеины, полисахариды и др.). Таким образом, без изучения и понимания данных вопросов невозможно широкое практическое использование грибов и синтезируемых ими ферментов и биологически активных соединений.

Среди грибов, вызывающих белую гниль древесины, особое место занимают представители рода *Trametes* – одни из самых эффективных деструкторов растительных и древесных субстратов, лигноцеллюлолитический комплекс которых включает лакказы, пероксидазы и целлюлолитические ферменты. Следует отметить, что большинство биотехнологически значимых базидиомицетов – продуцентов лакказ, пероксидаз, протеолитических ферментов и экзополисахаридов, принадлежит к данному роду, в связи с чем, детальное изучение ферментативных систем грибов рода *Trametes* имеет, не только фундаментальное, но и практическое значение. Поэтому исследование мультигенного семейства лакказ гриба белой гнили *Trametes hirsuta* – одного из наиболее эффективного деструктора лигнина среди известных базидиомицетов, является актуальным как с фундаментальной, так и с практической точек зрения.

Цель исследования

В связи с вышеизложенным, целью работы является исследование мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsuta*, закономерностей экспрессии и продукции его членов на молекулярном уровне, включающем анализ транскриптома, протеома и секретома.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) Изучить динамику активностей лигнолитических ферментов, протеом и секретом *T. hirsuta* при культивировании на средах разного состава: глюкозо-пептонной

среде (ГП) и среде с внесением лигноцеллюлозного субстрата (ЛЦ), а также на обеих средах с индуктором биосинтеза лакказы (CuSO_4);

2) Изучить изменения экспрессионных профилей транскриптома *T. hirsuta* в ответ на внесение индуктора в среду культивирования, выявив при этом дифференциально экспрессирующиеся гены;

3) Идентифицировать гены, кодирующие изоферменты лакказ базидиального гриба *T. hirsuta*;

4) Изучить динамику экспрессии генов, кодирующих изоферменты лакказ базидиального гриба *T. hirsuta* при культивировании на средах разного состава и оценить влияние индукторов на профили экспрессии генов.

Методы исследования

В работе использовались классические микробиологические методы работы с базидиальными грибами, а также современные протеомные и молекулярно-генетические методы исследования. Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли в соответствии с общепринятыми алгоритмами.

Научная новизна и практическая значимость

В работе впервые проведено комплексное сравнительное исследование секретомов, протеомов и транскриптомов базидиального гриба белой гнили *Trametes hirsuta* при его культивировании на средах различного состава. В геноме гриба *T. hirsuta* установлено наличие мультигенного семейства лакказ, включающее не менее 5 генов (*lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD* и *lacE*), кодирующих данный фермент и проведен *in silico* анализ полученных аминокислотных последовательностей лакказ (LacA, LacB, LacC, LacD и LacE), кодируемых данными генами.

В результате анализа секретомов гриба *T. hirsuta* охарактеризован ферментный состав лигнин модифицирующей системы (ЛМС) гриба и его изменения при индукции процессов лигнинолиза и биогенеза лакказ. Установлено, что *T. hirsuta* продуцирует различные группы внеклеточных ферментов, таких как гликозид-гидролазы, пептидазы, лакказы и гемовые пероксидазы в зависимости от условий и состава среды культивирования. В отличие от уже описанных видов возбудителей белой гнили древесины, которые преимущественно продуцируют ферменты с целлобиазной и ксилоназной активностью, ферменты, секретлируемые *T. hirsuta*, проявляют в основном глюкоканазную и маннозидазную активности. Впервые показано, что базидиомицет *T. hirsuta* в ответ на внесение в среду культивирования лигноцеллюлозы секретирует значительные количества церато-платанинов –

низкомолекулярных белков с экспансин-подобной активностью, способных разрушать нековалентные связи в полисахаридах клеточной стенки, что может свидетельствовать о возможном участии этих белков в процессах деградации лигноцеллюлозных субстратов сапротрофными грибами.

Сравнительный анализ протеомов гриба *T. hirsuta* показал, что при внесении в среду культивирования ионов меди – индукторов биогенеза лакказ, увеличивается продукция ферментов дыхательной цепи (β -субъединицы АТФ-синтазы), а также молекулярного шаперона семейства HSP70 и его активатора белка Sti1. Выявлены потенциальные метаболические пути, связанные с биогенезом лакказ: впервые показаны изменения в экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма углеводов, метаболизма пуриновых и пиримидиновых оснований, а также дыхательной цепи базидиомицета *T. hirsuta*.

В результате анализа транскриптомов базидиального гриба *T. hirsuta* установлены закономерности регуляции транскрипции индивидуальных изоферментов лакказ гриба *T. hirsuta*, кодируемых различными генами мультигенного семейства и показана их дифференциальная экспрессия в зависимости от условий и продолжительности культивирования гриба.

В результате *in silico* анализа полученных аминокислотных последовательностей лакказ (LacA, LacB, LacC, LacD и LacE) предсказаны их физико-химические свойства. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей лакказ мультигенного семейства гриба *T. hirsuta* и других лакказ базидиомицетов рода *Trametes* показал, что гетерогенность внутри лакказного семейства гриба *T. hirsuta* выше, чем гетерогенность между ними и другими представителями лакказных семейств грибов других видов грибов *Trametes* sp, что позволило выделить функциональные кластеры изоферментов, отличающиеся физико-химическими, биохимическими и каталитическими свойствами. Выдвинуто предположение, что на стадиях деградации лигнина, сопровождающихся повышенной продукцией протеолитических ферментов наиболее активно будут продуцироваться лакказы кластера С с более высокой степенью гликозилирования.

Степень достоверности результатов проведённых исследований

Выводы, представленные в этой работе, полностью подтверждены экспериментальными данными. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Используемые методики исследования и проведенные расчеты корректны, полученные экспериментальные закономерности статистически достоверны.

Положения диссертации, выносимые на защиту

- 1) На основании секретомного анализа показано, что основными ферментами, продуцируемыми на ГП и ЛЦ средах без индуктора и в присутствии ионов меди, являются гликозид-гидролазы различных семейств, пептидазы, лакказы и гемовые пероксидазы. Оксидоредуктазы образуют наиболее обширную группу среди секретируемых *T. hirsuta* ферментов. При этом множественные изоформы/изоферменты лакказ и марганец-независимых пероксидаз играют основную роль в процессе деградации лигнина.
- 2) Транскрипционный анализ показал, что ионы меди влияют на процессы метаболизма углеводов: цикл трикарбоновых кислот, гликолиз/глюконеогенез, пентозо-фосфатный путь, глиоксилатный цикл. Установлено изменение экспрессии генов, кодирующих ферменты, которые участвуют в процессах окислительного фосфорилирования, метаболизма пуриновых и пиримидиновых оснований.
- 3) Мультигенное семейство лакказ *T. hirsuta* состоит как минимум из пяти генов, кодирующих индивидуальные изоферменты. Изофермент лакказы LacA является мажорной и, по-видимому, конститутивной формой, продуцируемой во всех изученных условиях. Остальные изоферменты представляют собой индуцибельные формы, экспрессия которых регулируется специфическими эффекторами, и, вероятно, связана с различиями в выполняемых функциях. Наибольшее влияние CuSO_4 оказывал на уровень экспрессии генов *lacA* (индукция экспрессии до 400 раз), *lacB* и *lacC* (до 100 раз). Растворимый лигнин максимально индуцировал экспрессию генов *lacB* и *lacE* (до 70-кратного увеличения).

Апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ. Основные результаты работы представлены на следующих мероприятиях: V Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011); IV Международная конференция по экологии, промышленности и прикладной микробиологии «BioMicroworld 2011» (Торремолинос, Испания, 2011); Международная школа-конференция молодых ученых, посвященная 80-летию Брянской государственной инженерно-технологической академии (Брянск, 2011); Международная конференция «Oxizymes 2012» (Марсель, Франция, 2012); Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, Белоруссия, 2012); 38-ой Международный конгресс Федерации Европейских биохимических обществ – FEBS (Санкт-Петербург, 2013); 5-ый Конгресс

Европейских микробиологических обществ - FEMS (Лейпциг, Германия, 2013); VII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013); Международная конференция «Oxizymes 2014» (Вена, Австрия, 2014); 6-ой Конгресс Европейских микробиологических обществ – FEMS (Маастрихт, Нидерланды, 2015).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Семейство полимедных оксидаз в лигнинмодифицирующем комплексе грибов белой гнили

Лигнин представляет собой нестереорегулярный нерастворимый полимер. Его молекулы состоят из фенилпропаноидных остатков, соединенных несколькими типами углерод – углеродных и эфирных связей. При синтезе лигнина данные остатки соединяются друг с другом случайным образом с помощью различных химических связей, устойчивых к химическому расщеплению. Кроме того, в растениях лигнин образует комплекс с гемицеллюлозой, в которой заключены проводящие пучки. Лигнин обуславливает механическую устойчивость растений к повреждениям и действию микроорганизмов.

Согласно современным представлениям, биодеструкция и модификация природных биополимеров, таких как лигнин и целлюлоза, базидиомицетами происходит по трем основным путям: с помощью ферментативной деградации (за счет молекулярной трансформации субстрата с изменением свойств, а так же с возможным синтезом *de novo* и последующим полным разложением субстрата), опосредованно ферментативной деградации, основанной на формировании радикалов в качестве основных и побочных продуктов ферментативных реакций с последующим запуском радикальных процессов, и неферментативной деградации, осуществляемой за счет реакционноспособных радикалов и ионов металлов переменных валентностей [14]. Как правило, в природе эти процессы взаимосвязаны и образуют сложную сеть последовательных реакций, с участием всех вышеперечисленных механизмов. В результате осуществляется смешанный тип деградации, за счет чего наблюдается синергический эффект деструкции природных полимеров. Тем не менее, основной вклад в процесс деградации вносят ферментативная и опосредованно ферментативная составляющая. Основное участие в этом процессе принимают лигнолитические ферменты, такие как лакказы и другие полимедные оксидазы, различные группы пероксидаз (лигнин-пероксидазы, марганец-пероксидазы, пероксидазы-деколоризаторы, полифункциональные пероксидазы), а так же вспомогательные ферменты (например, перекись генерирующие глиоксальоксидазы, арилалкогольоксидазы) [1]. В зависимости от физиологических особенностей, занимаемой биологической ниши и пр. в значительной степени изменяется качественный и количественный состав комплекса секретируемых белков у базидиомицетов.

1.1.1. Структура семейства полимедных оксидаз базидиомицетов

Базидиомицеты-возбудители белой гнили древесины являются единственными организмами, способными модифицировать и даже минерализовать (до CO_2 и H_2O) все компоненты древесины, в первую очередь целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнин [15–18], а так же обладают уникальной способностью разлагать ароматические гетерогенные и химически устойчивые фенилпропаноидные единицы лигнина [19,20].

Разложение древесины и полимерных молекул лигнина растительной клеточной стенки базидиомицетами возможно благодаря продукции комплекса лигнинмодифицирующих ферментов (ЛМФ), который включает внеклеточные металлсодержащие оксидоредуктазы, (в основном гемсодержащие пероксидазы) [2,21] и полимедные оксидазы (такие, как лакказы) [22,23].

В результате многолетних исследований процесса биодegradации лигнина грибами белой гнили и другими микроорганизмами постепенно становятся ясными биологические механизмы разложения древесины и лигноцеллюлозы. Сейчас уже очевидно, что ферментативные и химические, в основном внеклеточные окислительные реакции, образуют сложный комплекс процессов, обеспечивающих деградацию биополимеров [24]. Помимо окислительных металлоферментов, таких как лигнин-, марганец- и версатилпероксидаз (LiPs, MnPs, VPs) [25] и лакказ [26], в процессе деградации активно протекают реакции с участием секретлируемых вторичных метаболитов, таких как фенольные и другие ароматические соединения, небольшие пептиды и органические кислоты, производные лигноцеллюлозы, а так же ионы металлов [24,27].

Одним из наиболее обширных семейств, ферменты которого активно участвуют в процессах деструкции лигноцеллюлозного сырья является семейство полимедных оксидаз, к которому относят многочисленные грибные лакказы.

Благодаря филогенетическому анализу было установлено, что «голубые» медьсодержащие оксидазы, использующие уникальные окислительно-восстановительные свойства ионов меди, образующих активный центр ферментов, произошли от небольших белков прокариот - азуринов и эволюционировали до эукариотических белков плазмы крови человека купредоксинового суперсемейства - церулоплазминов [28]. Суперсемейство купредоксинов включает следующих представителей: рустицианин, стеллацианин, амицианин, азурин, псевдоазурин, пластоцианин, медьсодержащая нитрит-редуктаза (EC 1.7.99.3), лакказа (EC 1.10.3.2), L-аскорбат оксидаза (EC 1.10.3.3), церулоплазмин (EC 1.16.3.1), цитохром C-оксидаза (полипептид II, К.Ф. 1.9.3.1), убихинон-оксидаза (полипептид II, EC 1.10.3.-). Это суперсемейство служит примером вариации содержания металлопростетических групп - в нем представлены все типы сайтов связывания ионов меди.

При этом уровень идентичности белков не коррелирует с содержанием ионов меди и электрон-транспортной функцией [29].

Анализ геномов базидиальных грибов показал у них существование многочисленных генов, кодирующих полимедные оксидазы [30]. Кластеризация ПМО (рис. 1) выявила ряд групп внутри семейства: лакказы *sensu stricto*; грибные ферроксидазы (Fet3-type); мультифункциональные ферроксидазы/лакказы, грибные пигментные ПМО (pigment MCOs), грибные аскорбатоксидазы.

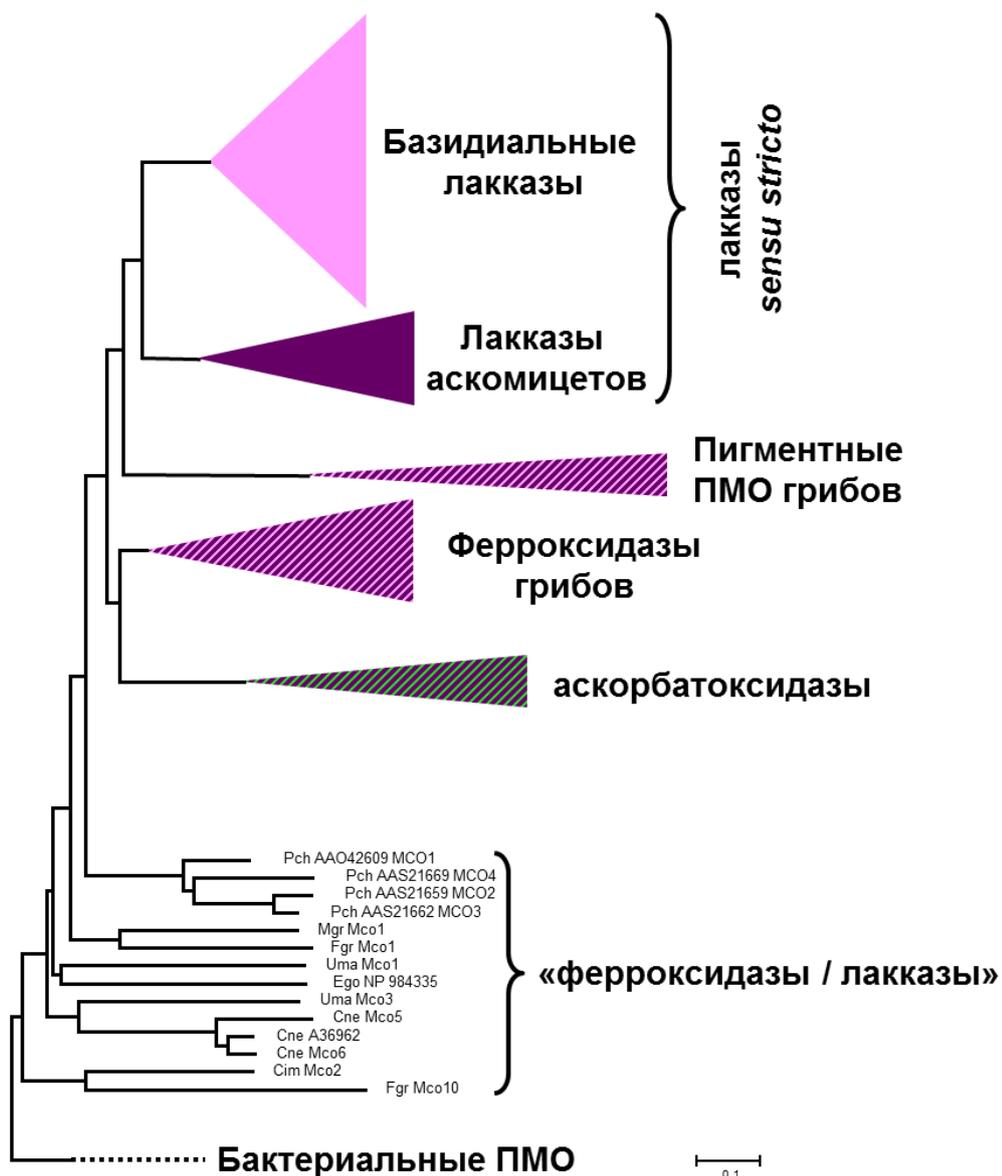


Рис. 1. Кластеризация полимедных оксидаз высших грибов [31].

Грибные лакказы это секретируемые ферменты, функционирующие в различных условиях окружающей среды (почва, древесный субстрат, вода). Среди физиологических групп грибов, лакказы характерны для базидиомицетов – возбудителей белой гнили древесины и близкой к ним группы грибов-сапротрофов, то есть видов, осуществляющих

деградацию лигнина. Вероятно, среди отдела базидиомицетов группа лакказ *sensu stricto* является специфичной для класса Agaricomycetes. При этом функционально лакказы *sensu stricto* различных биологических групп (например, аскомицетов и базидиомицетов) имеют сходные физиологические функции и участвуют в различных биологических процессах, таких как, деградация лигноцеллюлозы [32,33], окисление токсичных фенольных соединений [34] и др. Пристальное внимание исследователей уделяется этим ферментам, обладающим широкой субстратной специфичностью и способным окислять различные органические соединения, что делает их привлекательными для промышленного применения. Несмотря на тщательный анализ значительного количества базидиальных (и не только) лакказ, остается много вопросов, касающихся их эволюционного происхождения, физиологических функций, а так же путей синтеза и регуляции.

В геномах большинства организмов присутствует кластер генов, кодирующих мультифункциональные ферроксидазы/лакказы. В том числе это относится к грибу *P. chrysosporium*, для которого показано отсутствие классических лакказ в геноме. Эти ферменты характеризуются значительной ферроксидазной и низкой лакказной ферментативной активностью, и являются не типичными лакказми. Ферменты этой группы отличаются между собой по субстратной специфичности и, вероятно, по физиологическим функциям. Так, мультифункциональные ферменты из *Cryptococcus neoformans* могут окислять аминифенолы и полифенолы и участвовать в синтезе гетерогенных антиоксидантных пигментов меланина [35], за счет превращения дифенольных и индольных субстратов, таких как катехоламин, L- и D-DOPA, дофамин и адреналин, а так же кофейной кислоты [36]. Так же, вероятно, эти ферменты могут играть роль в формировании танинов коры, в образовании смолы и при деградации древесины деревьев [37].

Большинство базидиомицетов содержат в геноме гены, кодирующие канонические ферроксидазы (Fet3-типа). Fet3 ферменты обладают высоким сродством к ионам железа и способны окислять Fe^{2+} до Fe^{3+} . Они входят в состав системы метаболизма железа [38–40]. Окисление ионов железа необходимо для их переноса через цитоплазматическую мембрану клетки с помощью белкового комплекса, образованного Fet3 и специфической пермеазой Ftr1, для регуляции транспорта железа в форме Fe^{3+} ионов [41,42]. Кроме того, эксперименты с мутантными формами *Saccharomyces cerevisiae* по гену Fet3 показали гиперчувствительность гриба к концентрации ионов меди, что позволило предположить участие фермента в метаболизме меди [43]. Делеция гена, отвечающего за белок Fet3, приводила к нарушению клеточного гомеостаза железа, а так же делало дрожжи чувствительными к ионам меди. Авторы предположили, что ферроксидазы играют роль в

защите клеток против токсичности меди, т.к. мутантные формы реагировали на высокую концентрацию ионов Cu^{2+} в среде (>700 мкМ).

Четвертый кластер объединяет грибные пигментные ПМО, и на данный момент включает в себя 4 фермента из *Ustilago maydis* и *Schizophyllum commune*. Это одна из наименее изученных групп ПМО. Ее название происходит от фермента из *Aspergillus nidulans* [31] – белка, обладающего лакказной активностью и, по-видимому, участвующего в пигментации конидий. У *A. nidulans* данный фермент способен модифицировать прекурсор желтого цвета в зеленые пигменты, придающие конидиям гриба характерную окраску [44,45]. В целом же специфические реакции и разнообразие субстратов лакказ и лакказоподобных белков, участвующих в биосинтезе DHN-меланина (1,8-дигидрокси-нафталин) еще предстоит определить [46].

Аскорбатоксидазы грибов так же малоизучены, в основном описаны ферменты растительного происхождения [47]. Их биологические функции до конца не определены. Существуют косвенные доказательства участия растительных аскорбатоксидаз в утилизации кислорода и его активных форм (АФК), в различных стрессовых и защитных реакциях, сигнальной трансдукции, а также в росте и формировании клеточной стенки [48,49].

Вероятно, присутствие в геномах микроорганизмов большого количества генов полимедных оксидаз может быть объяснено широким спектром функций, выполняемых ими у данных организмов. Это предположение косвенно подтверждается и разнообразием субстратов, окисляемых этими ферментами. Представители семейства полимедных оксидаз значительно отличаются по субстратной специфичности. В то время как лакказы способны окислять фенольные субстраты, другие ПМО обладают более узкой специфичностью: аскорбатоксидаза окисляет аскорбат с образованием дегидроаскорбата [50,51]; пигментные ПМО окисляют дигидрокси-фенилаланин до ДОФА-хинона в ходе синтеза меланина [46].

На данный момент сложно четко определить основную биологическую функцию многих лакказоподобных белков со свойствами и субстратной специфичностью аналогичными или близкими лакказам [52]. Однако не вызывает сомнения, что все многофункциональные полимедные оксидазы эволюционно связаны между собой. Вполне возможно, что в ходе эволюционной дивергенции, первоначальные функции ферментов не были полностью утрачены. Филогенетический анализ, проведенный в ходе различных работ [10,31,53] показал, что в грибах классические лакказы (лакказы *sensu stricto*) и классические ферроксидазы (Fet3-типе ферроксидазы) сформировались в ходе независимых эволюционных путей, но в то же время существует эволюционная группа, сохранившая условно оба типа этих ферментов (ferroxidases/laccases).

1.1.2. Генетическая организация базидиальных лакказ

Начиная с 1883 года, когда была найдена первая лакказа из лакового дерева *Rhus vernicifera*, у грибов выделено и охарактеризовано по биохимическим показателям (обычно с использованием различных субстратов, таких как АВТС - 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин 6-сульфонат, 2,6 - диметоксифенол и сирингалдазин) уже более 100 индивидуальных лакказ, а количество охарактеризованных генов достигает нескольких сотен. В связи с этим должно складываться впечатление, что лакказы являются одними из наиболее изученных ферментов. Тем не менее, более детальный анализ литературы показывает, что об их биологической организации, функциях, осуществляемых в природе, процессах биосинтеза, а так же природных субстратах известно не так много. Помимо классического обзора о структуре грибных лакказ [54], достаточно подробно в обзорах систематизированы возможные биологические функции этих ферментов [55–57]. Предполагается, что лакказы грибов участвуют в деградации лигноцеллюлозы, в цикле разложения органического вещества в природе, и важны для осуществления эктомикоризного образа жизни, участвуют в формировании плодовых тел [58], и в различных путях синтеза пигментов [46], в патогенезе, а так же вырабатываются в качестве защитного механизма в ответ на стрессовые факторы, однако подробности участия фермента во всех этих процессах остаются малоизученными [30]. В последнее десятилетие обнаружено большое количество лакказоподобных белков у прокариот [28]. Проведенный анализ указывает на их участие в пигментации клеток и метаболизме металлов.

Лакказы образуют в геномах базидиомицетов мультигенные семейства, представляя собой набор в различной степени дивергированных последовательностей. Число генов в семействе может варьировать от двух копий, как в случае *Schizophyllum commune* [59] и *Postia placenta* [10], до более чем десятка копий, как у *Coprinopsis cinerea* (17 генов) [60] и *Pleurotus ostreatus* (11 генов) [61–66] (табл.1).

Таблица 1. Представленность генов ПМО и лакказы в геномах грибов различных групп и дрожжей. (По данным [30] и [11])

Организмы	Занимаемая экологическая ниша	ПМО*, общее количество генов	Из них только лакказы, количество генов		№ в базе данных NCBI (последовательности белков истинных лакказ)
<i>Trametes versicolor</i>	Сапротроф	10	7	Базидиомицеты, возбудители белой гнили древесины	gi:15617227; gi:2833233; gi:63147346; gi:63147348; gi:365784263; gi:636614197; gi:636614307
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Сапротроф	12	11		gi:646301844; gi:646306074; gi:646306072; gi:646306071; gi:646305176; gi:646305170; gi:646305153; gi:646305118; gi:646303358; gi:646303654; gi:646303653
<i>Dichomitus squalens</i>	Сапротроф	13	11		gi:597989891; gi:597989393; gi:597970761; gi:597970335; gi:395325559; gi:395334836; gi:395327683; gi:597993835; gi:597985483; gi:598003275; gi:598003325
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Сапротроф	5	0		-
<i>Schizophyllum commune</i>	Патоген растений	6	2		gi:3273348; gi:300102852
<i>Stereum hirsutum</i>	Патоген растений	20	9		gi:597903964; gi:618808931; gi:618805911; gi:597909924; gi:597908916; gi:618817294; gi:597903812; gi:389747540; gi:389746441
<i>Postia placenta</i>	Сапротроф	4	2	Базидиомицеты, возбудители бурой гнили древесины	gi:220729877; gi:220724962
<i>Serpula lacrimans</i>	Сапротроф	6	4		gi:597933746; gi:597933466; gi:597929484; gi:336368589
<i>Coprinopsis cinerea</i>	Сапротроф	17	17	Базидиомицет, неразлагающий древесину сапротроф	gi:42721544; gi:37703767; gi:37703769; gi:37703771; gi:37703773; gi:37703775; gi:299750631; gi:37703779; gi:115371531; gi:115371533; gi:115371535; gi:115371537; gi:115371539; gi:115371541; gi:115371543; gi:115371545; gi:115371547

<i>Laccaria bicolor</i>	Симбионт, эктомикоризный вид	11	9	Базидиомицет, микоризо- образователь	gi:224472740; gi:224472738; gi:224472736; gi:224472732; gi:224472742; gi:224472734; gi:224472730; gi:224472728
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Патоген человека	6	0	Базидиомицеты	-
<i>Ustilago maydis</i>	Патоген растений	6	0		-
<i>Дрожжи</i>		3-5	0	Прочее	-

Филогенетические взаимосвязи индивидуальных генов мультигенного семейства лакказ не следуют строго видовой филогении грибов. Поэтому остается открытым вопрос: насколько связана эволюция этого фермента с воздействием различных факторов, например особенностями мест обитания. Так, например, аминокислотные последовательности лакказ грибов рода *Picnoporus* обладают 95% сходством, несмотря на то, что эти грибы могут расти на разных континентах, в то время как между всеми лакказами вида *Pleurotus eryngii* – только 57% сходства.

Многочисленные гены лакказ кодируют белки, длиной 520-550 аминокислот и включают N-концевой сигнальный пептид из 20 аминокислот для секреции фермента. Гетерогенность состава продуцируемых лакказ определяется не только множественностью содержащихся в геноме микроорганизма генов, кодирующих эти ферменты, но и различными посттрансляционными модификациями (протеолитический процессинг, гликозилирование и т.д.).

Практически все гены протяженностью от 1500 до 3000 п.н., кодирующие лакказы, обладают экзон-интронной структурой. Большинство последовательностей интронов, определенных в генах лакказ базидиомицетов и аскомицетов, достаточно консервативно распределяются по длине гена. При этом количество интронов колеблется в широких пределах - от 8 до 19 (в среднем – 8-13). Обычно длина интронов составляет 50–90 п.н., а их сплайсинг в основном проходит по сайтам GT-AG [67–69]. Анализ данных показал, что гены лакказ аскомицетов имеют меньшее количество интронов (1-6 интронов) по сравнению с генами лакказ из базидиомицетов. Тем не менее, несмотря на значительное количество интронов в генах лакказ, альтернативный сплайсинг для них показан не был.

In silico анализ промоторных областей генов лакказ из различных грибов показал наличие большого количества регуляторных элементов, дифференциально распределенных по «промоторной последовательности». Более детальное изучение этих областей выявило корреляцию между наблюдаемыми регуляторными эффектами при транскрипции генов лакказ и наличием специфических *cis*-элементов [69–71].

В общем случае, гипотетическая промоторная область генов лакказ представляет собой последовательность, весьма плотно «упакованную» регуляторными элементами, на протяжении всего региона (рис. 2).

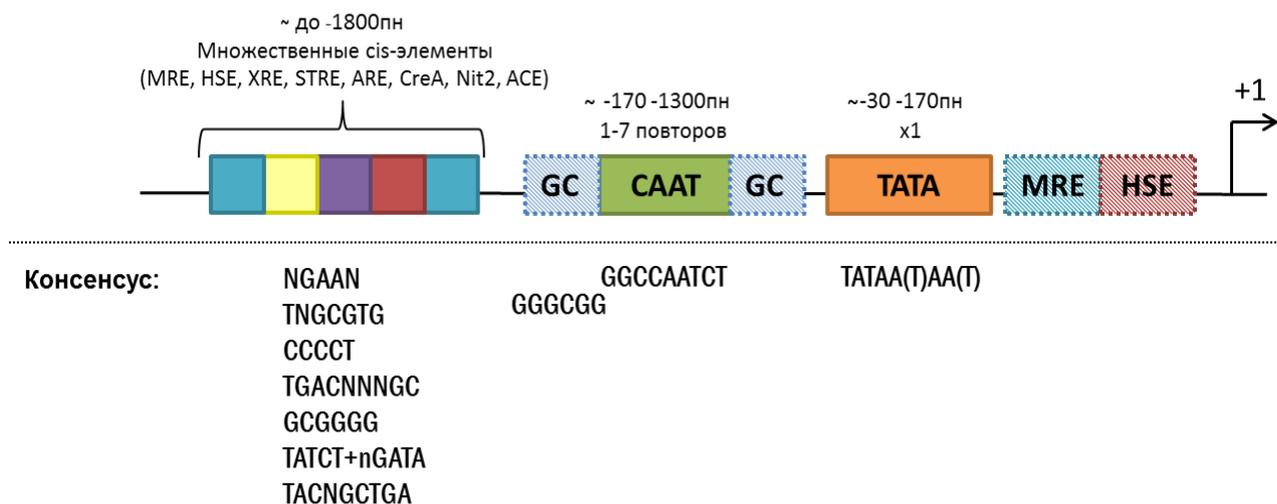


Рис. 2. Гипотетическая схема строения промоторных областей генов лакказ базидиальных грибов. (Распределение предполагаемых cis-элементов в промоторной области лакказ базидиальных грибов 1800bp выше сайта инициации транскрипции). Пунктиром обозначены элементы, не являющиеся строго обязательными для всех промоторных регионов лакказ (по [71] и [72]).

Все охарактеризованные промоторные регионы лакказ содержат ТАТА последовательности, необходимые для инициации транскрипции и, по крайней мере, одну СААТ консенсусную последовательность, играющую роль в общем контроле транскрипции.

Существующие данные о регуляции экспрессии генов лакказ указывают на присутствие в промоторных областях регуляторных элементов реагирующих на различные физиологические факторы – cis-элементы, регулируемые присутствием ионов металлов (MRE – metal responsive element), ксенобиотиков (XRE – xenobiotic responsive element), белков теплового шока (HSE – heat shock responsive element) или окислительным стрессом (ARE – antioxidant response element) [72]. Существует гипотеза, что количество (до 21) и селективность (специфичность) HSE в различных генах лакказ одного и того же организма определяют его эволюционный прогресс [73,74]. Множественные копии MRE обнаружены в промоторных областях генов металлотионеинов у *Saccharomyces cerevisiae*, необходимых для индукции транскрипции этих генов ионами тяжелых металлов, что свидетельствует о способности организма реагировать на тяжелые металлы. Увеличение синтеза лакказ базидиомицетом *Trametes pubescens* в качестве реакции на внесение в питательную среду тяжелых металлов подтверждает, что присутствие MRE в промоторе генов имеет физиологическое значение [71]. Более того, в промоторных областях идентифицированных генов, кодирующих лакказы в *Ceriporiopsis subvermispora*, *Fusarium oxysporum*, *P. ostreatus*, *Ganoderma sp.*, *Trametes sp.* так же найден сайт связывания транскрипционного фактора

ACE1, который активирует транскрипцию лакказы в ответ на индукцию медью [75,76]. ACE1 связывают с регуляцией транскрипции ионами меди, т.к. у некоторых видов такая индукция происходила даже в отсутствии сайтов MRE в промоторной области генов лакказ [77]. Аналогичные сайты найдены и в генах, кодирующих другие белки, транскрипция которых связана с индукцией медью – Cu/Zn супероксиддисмутаза, металлотионеины и проч. [78,79].

Различия в количестве копий и распределении XRE в промоторах генов лакказ связывают с их дифференциальной индукцией в ответ на различные ароматические соединения [80]. Например, у базидиомицета *Trametes* sp. AH28-2, о-толуидин селективно индуцировал экспрессию изофермента LacA, в то время как 3,5-дигидрокситолуол в основном влиял на экспрессию гена, кодирующего другой изофермент (LacB).

Для некоторых грибов установлено, что экспрессия генов лакказ подвержена катаболитной репрессии: предполагается, что это своего рода механизм энергосбережения у микроорганизмов. Высокая концентрация углерода в среде (около 15 г/л) ингибирует транскрипцию лакказы у базидиомицетов *T. pubescens* [68], и *Trametes* sp. AH28-2. Показано, что cis-элемент creA (сайт цАМФ-опосредованной глюкозной катаболитной репрессии), найденный в промоторах нескольких грибов, принимает участие в механизме репрессии, который широко используется для увеличения продукции лакказы [81]. Три цАМФ чувствительных элемента были описаны в промоторной области генов лакказ в *Trametes* sp., что свидетельствует о роли цАМФ в регуляции транскрипции лакказы, аналогичной для лигнин- и марганец зависимых пероксидаз, как уже было ранее установлено для *Phanerochaete chrysosporium* [80]. Другим регуляторным элементом, обнаруженным в промоторных областях генов лакказ, является фактор азотной катаболитной репрессии (NIT2), индуцирующий экспрессию многих структурных генов в условиях ограничения доступа азота. Он содержит повторяющиеся GATA последовательности, располагающиеся на расстоянии 30 п.н. друг от друга, и NIT2 связывающий сайт с консенсусной TATCDH последовательностью [82].

По мнению ряда авторов [72,80], наличие повторяющихся последовательностей cis-элементов в промоторных областях генов лакказ, подразумевает регуляцию синтеза лакказ на транскрипционном уровне, в зависимости от источника углерода и азота, а так же под влиянием ксенобиотиков и ионов тяжелых металлов [70]. При этом различия числа копий, местоположения или направления регуляторных элементов определяют дифференциальную картину транскрипции генов лакказ в зависимости от условий роста и физиологического состояния микроорганизма.

1.1.3. Регуляция синтеза лакказ

Существующие работы по изучению биосинтеза лакказ позволили сделать несколько выводов: накопление мРНК лакказ сопровождается увеличением соответствующей ферментативной активности в среде культивирования грибов; но при достижении пика активности мРНК лакказы в клетках мицелия не детектируются [83]. Таким образом, в настоящее время предполагается, что:

а. по истечении определенного времени культивирования происходит деградация транскриптов лакказ и завершается транскрипция генов, а, следовательно, прекращается экспрессия лакказы;

б. биосинтез грибных лакказ главным образом регулируется на уровне мРНК [80,83].

Ориентируясь на эти утверждения, значительную роль в изучении процессов биосинтеза лакказ отводят изучению регуляторных некодирующих областей генов этих ферментов. Известно, что регуляция генов лакказ и пероксидаз связана с целым комплексом экологических сигналов, таких как концентрация углерода и азота в питательной среде, наличие ксенобиотиков и ионов металлов, воздействие теплового шока и длина светового дня [84]. Лигнолитические ферменты, в том числе лакказы, в основном являются продуктами вторичного метаболизма грибов, который включается при недостатке доступных источников азота и/или углерода [85]. Поэтому для эффективной продукции лакказ важны как количество и тип источников углерода и азота по-отдельности, так и их соотношение в среде.

Было показано, что азот играет ключевую роль в продукции лакказ, причем изоферментный состав фракции лакказ зависит как от концентрации азота, так и от его источника. Изменение активности лакказы в ответ на концентрацию азота является спорным вопросом: существуют данные об увеличении активности, как в условиях ограничения доступного азота, так и в условиях неограниченного доступа питательных веществ. В целом, неорганические источники азота снижают продукцию лакказ при сохранении уровня биомассы гриба, в то время как органические источники позволяют добиться высокого выхода фермента. Продукция фермента также увеличивается при внесении в среду дополнительного источника азота, например L-аспарагина [86]. Грибы выработали механизмы катаболизма различных форм азота и регуляции экспрессии ферментов, необходимых для его ассимиляции, в ответ на клеточный уровень азотистых соединений. Одним из элементов этих механизмов является белковый транскрипционный фактор NIT2, который связывается со специфическими элементами распознавания ДНК и регулирует транскрипцию генов, участвующих в метаболизме азота [82,87]. Так регуляция азотом у

Neurospora crassa включает экспрессию спектра взаимонесвязанных структурных генов, которые кодируют ферменты, необходимые для утилизации различных вторичных источников азота, когда первичные источники азота (например аммоний или глутамин) недоступны [82,87]. NIT2-регуляторный ген необходим для включения экспрессии ферментов катаболизма азота в условиях ограничения азота. Полная нуклеотидная последовательность гена кодирует белок в 1036 аминокислотных остатков с молекулярной массой около 116 кДа. При этом белок содержит один мотив цинкового пальца Cys2/Cys2 типа и смежные положительно заряженные области, которые вместе образуют ДНК-связывающий домен. Т.к. в промоторной области генов лакказ были найдены NIT2 cis-элементы, по-видимому, лакказы так или иначе связаны с катаболизмом азотистых соединений на уровне вторичного метаболизма.

Различные изоферменты лигнинмодифицирующих белков могут дифференциально экспрессироваться в зависимости от типа источника углерода и его концентрации. Благодаря существованию сайта creA предположительно регуляция углеродом происходит по цАМФ механизму. Внутриклеточными рецепторами цАМФ являются цАМФ-зависимые протеинкиназы. В свою очередь, киназы, при связывании с цАМФ, фосфорилируют специфичные регуляторные белки, которые связываются с целевой последовательностью ДНК (creA) или со связывающим элементом второго белка-активатора в 5' некодирующей области регулируемых генов [88]. Показано, что у грибов транскрипционный фактор creA способен репрессировать экспрессию целлюлаз и ксиланаз [89,90]. Однако, в предыдущих исследованиях отмечена положительная корреляция между резким ростом внутриклеточного уровня цАМФ и переходом от первичного к вторичному метаболизму у filamentарных грибов [91]. Согласно данным Boominathan и Reddy, значительное увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ предшествует активной продукции MnP и LiP, что может свидетельствовать о его ключевой роли в регуляции продукции пероксидаз у *P. chrysosporium*.

Ранее было показано [71,92–94], что индукторами биосинтеза лакказ являются тяжелые металлы, в том числе ионы меди. Традиционно механизм индукции связывали с регуляцией экспрессии на уровне мРНК, что подтвердилось после нахождения в промоторных областях генов лакказ MRE cis-элементов. Металлозависимые системы транскрипции генов играют важную роль в метаболизме металлов и процессах детоксификации [95], и широко распространены у эукариот. В настоящий момент наиболее полно изучена система регуляции транскрипции для генов металлотионеинов (MT) - низкомолекулярных белков с высоким содержанием цистеина, способных связывать ионы металлов, таких как медь, цинк, ртуть, кадмий и др. Показано, что у высших эукариот в регуляторной области этих генов

содержатся многочисленные копии MRE, ответственные за индукцию транскрипции генов МТ в ответ на тяжелые металлы [96,97]. Роль металлотионеинов в процессах защиты от интоксикации организмов ионами тяжелых металлов коррелирует со способностью некоторых металлов, включая цинк, медь, кадмий и другие активировать транскрипцию МТ генов [98,99]. Механизмы регуляции ионами металлов были изучены для систем транскрипции генов МТ [100] и некоторых других металлозависимых транскрипционных систем [101,102]. Было доказано, что регуляция МТ происходит через металл-регулируемые белки, которые одновременно являются рецепторами ионов металлов и транскрипционными факторами. Для базидиальных лакказ на примере гриба *P.ostreatus* проводились аналогичные исследования, результатом которого стала идентификация нескольких белков – потенциальных транскрипционных факторов (ТФ). MRE в промоторных областях генов лакказ связывали белки массой 25 кДа, 30 кДа и 15 кДа. При этом средство к тому или иному ТФ отличалось в зависимости от исследуемой регуляторной области разных генов лакказ и определялось прежде всего строением (консенсусной последовательностью) самого MRE [103]. Авторами было выдвинуто предположение, что ответ на присутствие ионов тяжелых металлов предполагает связывание регуляторного фактора по типу отрицательной обратной связи с гептонуклеотидным ядром MRE, а фланкирующие последовательности могут влиять либо на само связывание, либо на взаимодействие с другими факторами [104].

В связи с существованием HSE в промоторных областях генов лакказ было выдвинуто предположение, что эти ферменты так же легко индуцируются повышением температуры [105]. Количественный RT-PCR анализ подтвердил эту гипотезу, продемонстрировав, что тепловой шок, индуцируемый при 45°C, увеличивал в 1,6-раз активность лакказы *T. versicolor* за счет повышения уровня продукции мРНК. Однако факторы транскрипции, участвующие в биосинтезе лакказ и являющиеся белками теплового шока, на данный момент не выявлены.

Еще одним важным механизмом, влияющим на экспрессию лигнолитических ферментов, в том числе лакказ, является убиквитин-протеасомный путь деградации белков. У эукариот убиквитин-протеасомный путь контролирует уровни внутриклеточных регуляторных белков, таких как регуляторы транскрипции [106]. Механизмы регуляции факторов транскрипции посредством убиквитин-протеасомного пути уникальны для каждого белка. В зависимости от класса ТФ их деградация происходит в связанном или несвязанном с ДНК состоянии [107].

Впервые для отдела Basidiomycota 26S-протеасомы были найдены у лигнинразрушающих грибов *T. versicolor* и *P. radiata* [108]. Показано, что протеасомно-опосредованный путь связан с регуляцией активностей лигнолитических ферментов этих

видов грибов в условиях недостатка азота и углерода. Установлено, что протеасомная деградация играет важную роль в регуляции активности лакказы *T. versicolor* при воздействии кадмия; ингибирование протеасом сильно влияет на Cd^{2+} зависимую индукцию лакказ. Было выдвинуто предположение, что контролем стабильности активаторов транскрипции, вероятно, является процесс, при котором убиквитин-протеасомный путь может способствовать регуляции активности лакказы в условиях недостатка азота за счет контроля стабильности активаторов транскрипции [109].

Продукция комплекса ЛМФ грибов – возбудителей белой гнили древесины в основном характерна для вторичного метаболизма организма, переход к которому вызван снижением доступных питательных веществ в среде. Известно, что убиквитин-протеасомный путь отвечает за высокоселективную деградацию короткоживущих белков [110]. Обнаружено, что специфическое и селективное ингибирование протеасом приводило к увеличению активности лакказы в условиях ограничения доступного азота. Muratani и Tansey [111] предложили модель, в которой компоненты протеасомно-опосредованной системы связываются с промоторными регионами генов, кодирующих лакказы для регуляции деятельности многочисленных транскрипционных компонентов. Вполне возможно, что в условиях избытка азота уровень гипотетического фактора транскрипции (участвующего в регуляции экспрессии генов лакказ) остается низким из-за его стабильного протеолиза, в то время как в ответ на недостаток азота этот уровень увеличивается в связи с нарушениями убиквитинирования этого фактора транскрипции. В свою очередь, блокирование протеолиза за счет ингибирования протеасом приводит к повышению уровня гипотетического фактора транскрипции и, следовательно, повышенной экспрессии лакказ.

1.2. Синтез и процессинг секретлируемых лакказ

Молекулярные механизмы, лежащие в основе реакции эукариотических клеток на влияние внешней среды включают в себя клеточный ответ на уровне транскрипции РНК и трансляции белков, репарации ДНК и деградации белков. Продукция лакказ клетками грибов связана с достаточно длительными процессами синтеза и секреции этого белка. Грибные лакказы относятся к сложным с точки зрения структуры ферментам: белок содержит в активном центре 4 иона меди, а так же обладает высокой степенью гликозилирования (в среднем до 25%). При этом биосинтез лакказ должен включать все стадии, характерные для секреторных белков, такие как фолдинг, посттрансляционные модификации, а так же секрецию и экзоцитоз из клетки одним (а вероятно и несколькими) возможным секреторными путями. Естественно, что реализация каждого этапа сопровождается взаимодействием синтезируемого белка с целыми белковыми комплексами внутри клетки.

В силу особенностей своих природных субстратов ферменты, участвующие в биодеструкции лигнина, должны быть исключительно внеклеточными белками. Для базидиальных лигнин- и марганецпероксидаз это действительно так, однако, в случае лакказ ситуация несколько иная. Несмотря на то, что изученные лакказы в основном являются внеклеточными ферментами, известно о существовании и внутриклеточных форм. Большинство видов возбудителей белой гнили древесины, исследованные в работе [112], продуцировали как внеклеточные, так и внутриклеточные изоферменты лакказ с сходными свойствами (субстратная специфичность, рI). Аналогичные данные получены для *Trametes versicolor* при культивировании на средах, содержащих глюкозу и лигноцеллюлозные субстраты [113], а так же для *Agaricus bisporus* [114]. При этом основная активность лакказы детектировалась внеклеточно, в культуральной жидкости (95-98% от общей, в зависимости от среды, а в случае *A. bisporus* – 88%) и лишь остаточная активность отмечалась во внутриклеточных экстрактах. Также было показано, что часть активного фермента иммобилизована на клеточной стенке грибов [115]. На основании полученных данных было выдвинуто предположение, что внутриклеточные лакказы у грибов и периплазматические лакказы у бактерий участвуют в преобразовании низкомолекулярных фенольных соединений в клетке, например при пигментации клеток, а лакказы иммобилизованные на клеточной стенке и спорах микроорганизмов образуют меланин и защитные компоненты клеточных стенок [92,116]. В то же время показано, что внутриклеточные и поверхностно локализованные лакказы, могут представлять собой внеклеточные формы ферментов перед или в процессе их секреции. При этом, их биохимические свойства отличаются от свойств внеклеточных ферментов [117,118].

Предположительно, основными системами, участвующими в биогенезе (созревании) лакказ являются системы регуляции экспрессии с помощью различных транскрипционных факторов, фолдинга фермента и встройки меди в его активный центр, секреции белка, посттрансляционных модификаций.

Регуляция биосинтеза лакказ на транскрипционном уровне была рассмотрена более подробно в главе 1.1, здесь же представлены данные о белковых факторах, сопровождающих биогенез фермента в клетке и влияющих на него.

1.2.1. Системы секреции мицелиальных грибов

Механизмы традиционных путей секреции белков в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и в клетках млекопитающих довольно хорошо изучены и высококонсервативны. В тоже время, для мицелиальных грибов эти пути не установлены, а существуют лишь разрозненные данные. Так, на основе данных, полученных для эукариот, удалось клонировать и

охарактеризовать несколько генов, кодирующих факторы, участвующие в процессах секреции у аскомицетов: распознавания сигнала белков (SRP54) [119], фолдазы (протеин дисульфид изомеразу) [120–122], молекулярного шаперона эндоплазматического ретикулума (ЭР) - BiP [123,124], а так же компоненты везикулярной транспортной системы (функциональный гомолог GTP-связывающего белка SAR1p) [125].

Транспорт белков в гифы должен быть направленным и проходить под контролем соответствующих систем от места синтеза к апикальному концу или другому месту секреции внеклеточных ферментов (рис. 3). В клетках дрожжей и животных, эти процессы происходят в транспортных везикулах. Транспорт белков из эндоплазматической сети к плазматической мембране включает ряд процессов, начиная с отщепления транспортных везикул от донорных мест локализации, и заканчивая слиянием с акцепторными компартментами локализации белков.

По всей видимости, у мицелиальных грибов задействованы аналогичные системы. Быстрый апикальный рост гиф требует эффективной системы экзоцитоза прекурсоров клеточной стенки. Было установлено, что секреция белков происходит с помощью структур, уникальных для мицелиальных грибов, называемых "Spitzenkorper", через апикальные или субапикальные регионы гиф [126–128]. Они представляют собой скопление везикул, действующих в качестве центра распределения белков. Было так же выдвинуто предположение, что различные белки секретируются через различные сайты секреции [129]. Таким образом, подразумевается, что транспорт секретируемых белков является направленным, и специфичен для индивидуальных белков.

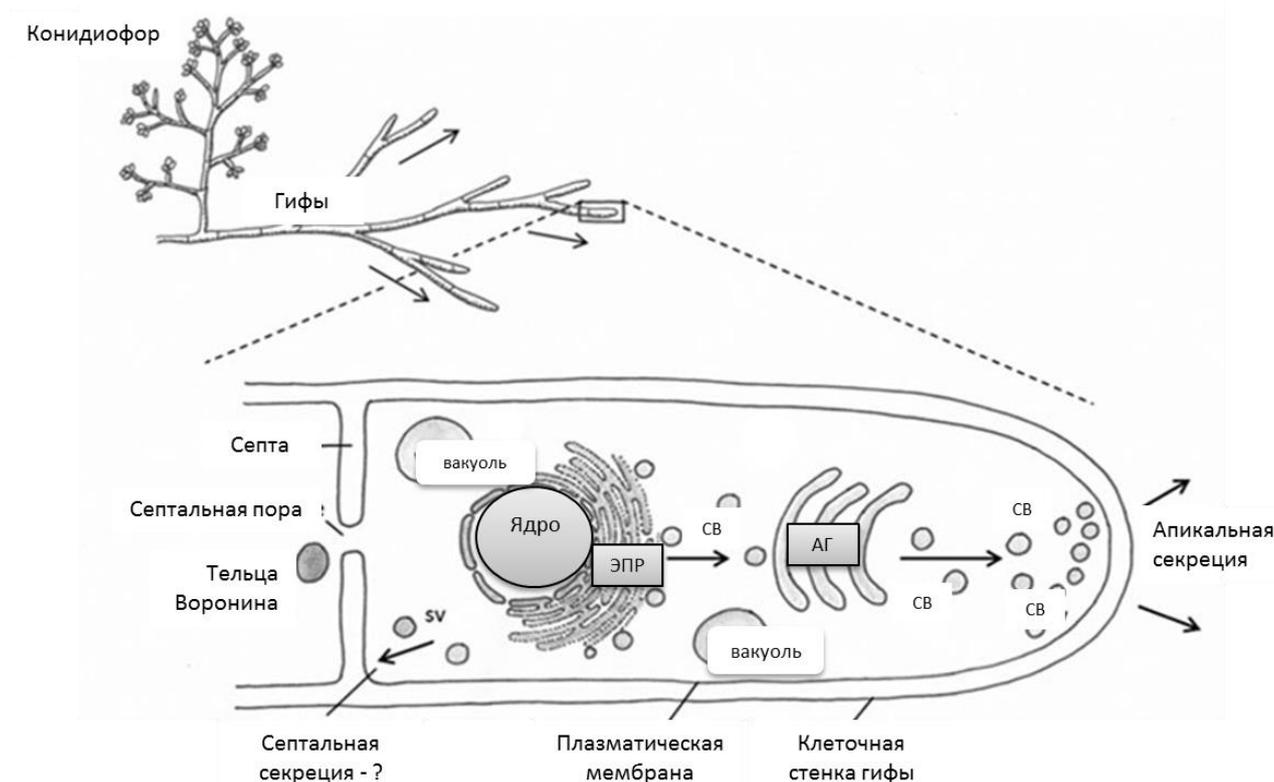


Рис. 3. Схематическое представление путей секреции белков у гриба *Trichoderma reesei*.

Белки, синтезируемые в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), перемещаются в составе секреторных везикул (СВ) в аппарат Гольджи (АГ) для дальнейших посттрансляционных модификаций. Секреторные везикулы затем переносят модифицированные белки к апикальному концу гиф для дальнейшей секреции из клетки. Также, по-видимому, возможны альтернативный транспорт и секреция белков с помощью СВ через перегородки (септы) гиф [130].

Секретируемые белки имеют сигнальную последовательность на N-конце аминокислотной цепи. При котрансляционной транслокации, вновь транслированная сигнальная последовательность опознается белковыми молекулами распознавания сигнала, и приостанавливает трансляцию, после чего комплекс белка с мРНК и рибосомой направляется к эндоплазматической мембране и с помощью белков семейства SEC проходит через ЭПР, одновременно с этим принимая конечную конформацию молекулы белка (Рис. 4). Фолдинг сопровождается участием молекулярных шаперонов, которые связываются с гидрофобными областями аминокислотной цепи и предотвращают нежелательные взаимодействия между этими регионами. Шапероны ЭПР включают белки семейства HSP70, самым важным из которых является BiP (binding protein).

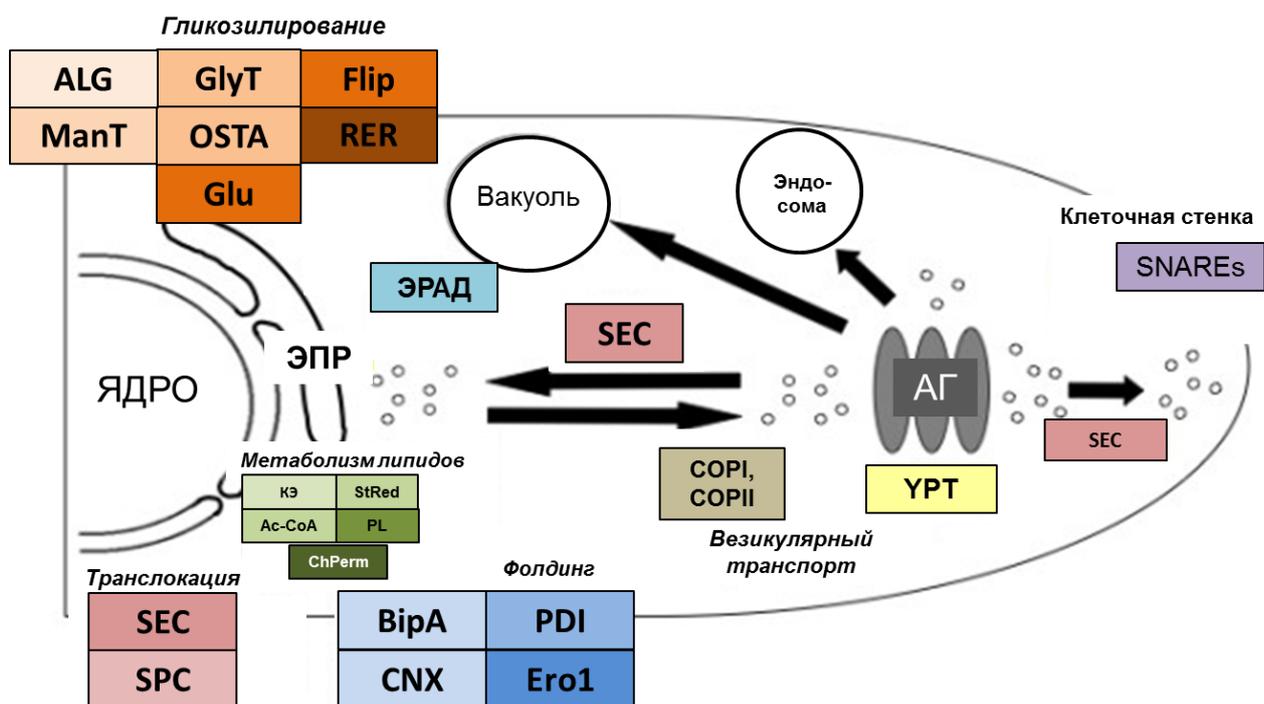


Рис. 4. Схема секреторного пути у *Aspergillus niger* и ферменты, участвующие в секреции внеклеточных белков. ЭПР – эндоплазматический ретикулум; АГ – Аппарат Гольджи. **Гликозилирование:** ALG – ферменты, участвующие в аспарагин-связанном гликозилировании, ManT – маннозилтрансферазы, GlyT – гликозилтрансферазы, OSTA – олигосахарилтрансферазы, Glu – глюкозидазы, Flip – флиппазы, RER- долихолсинтезирующие белки, GlcNAc-ацетилглюкозаминфосфотрансфераза. **Транслокация:** SEC – белки транслокационного комплекса мембраны ЭПР, SPC – сигнальные пептидазы. **Фолдинг:** BipA, CNX- молекулярные шапероны, PDI – дисульфид-изомеразы, Ero1 – оксидоредуктин эндоплазматического ретикулума. **Метаболизм липидов:** КЭ – карбоксилэстеразы, Ac-CoA – переносчик ацетил-CoA, ChPerm – холинпермеазы, стеролизомеразы, StRed –стерол редуктазы, PL – фосфолипазы. **Везикулярный транспорт** – COPI, COPII – везикулярные белки, транспорт из АГ и ЭР; ERD2, SNAREs – комплекс мембран-связанных белков, участвующих в слиянии везикул с плазматической мембраной; YPT – ГТФазы. ЭРАД – ЭПР-ассоциированная деградация (по данным [131] и [132]).

Одновременно с транслокацией и фолдингом вновь синтезированные секретируемые белки, претерпевают посттрансляционные модификации, а именно – гликозилирование. Тут же происходит контроль качества синтезированных белков. Неправильно свернутые или агрегировавшие белки удаляются из ЭР и деградирует с помощью ЭР-ассоциированной системы деградации белков ЭРАД (ERAD) [133].

После фолдинга и основного гликозилирования секретируемого белка, запускается его продвижение к внешней мембране клетки. Этот транспорт проходит в два этапа: на первом везикула передается от ЭР в комплекс Гольджи, а на втором - из Гольджи к плазматической мембране. Формирование транспортных везикул, транспорт белков и процесс слияния контролируются большим количеством белков и белковых комплексов в клетке. Мембран-связанные белки, называемые SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor atachment protein receptors), облегчают слияние между везикулами и целевыми мембранами. Результаты исследований указывают на существование нескольких функционально и пространственно разделенных SNARE белков у грибов и подтверждают их значимость для процессов секреции [132]. Предположительно, секретируемые белки передвигаются через аппарат Гольджи, внутри везикул, без накопления в местах синтеза и процессинга белка, к месту секреции в растущем апексе [134]. В настоящий момент у грибов удалось идентифицировать только несколько структур, аналогичных аппарату Гольджи в дрожжах [135]. Отсутствие данных о морфологии аппарата Гольджи в мицелиальных грибах затрудняет изучение механизма доставки белков к цитоплазматической мембране.

Недавние исследования позволили выявить несколько альтернативных секреторных путей, отличающихся от обычных, - через ЭР и аппарат Гольджи [136–138]. Одним из наиболее интересных путей является прямая секреция с помощью экстрацеллюлярных везикул [139]. Накопленные данные об альтернативных секреторных путях у дрожжей, растений и животных позволяют предсказать наличие других нетрадиционных механизмов секреции белков у мицелиальных грибов [140].

1.2.2. Формирование пространственной конформации лакказ и встраивание ионов меди

Так как лакказы являются медь-содержащими белками, естественно предположить, что существуют белки-посредники, осуществляющие доставку и встройку ионов меди в их активный центр.

Способность ионов меди служить донорами и акцепторами электронов делает их идеальным окислительно-восстановительным кофактором для ферментов. В то же время, медь является токсичным металлом, в первую очередь из-за способности генерировать гидроксильные радикалы (например, в реакциях Фентона), приводя к разрушению клеточных структур. Ионы Cu (II) расположены в верхней части ряда устойчивости Ирвинга-Уильямса [141], так же как и Cu (I). Они обладают высокой конкурирующей способностью среди аналогичных комплексов с ионами прочих металлов, и, следовательно, ионы меди способны вытеснить менее конкурентные металлы из комплексов с металлопротеинами. По

этим причинам клеточный запас ионов меди должен быть сбалансированным для поддержания их жизненно необходимой концентрации в клетке, но при этом с минимальным токсическим эффектом для нее. Организмы обладают несколькими механизмами для поддержания внутриклеточной концентрации меди на необходимом уровне, обеспечивающими ее связывание, распределение и выведение из клетки. Так, при высоких концентрациях меди, клетки вырабатывают металлотионеин-подобные белки, способные прочно связывать высокие концентрации металлов. При нормальных клеточных концентрациях меди, продуцируются медные металлошапероны, которые способствуют распределению ионов меди по различным путям метаболизма: в митохондриях, к секреторному пути или к месту синтеза цитоплазматических ферментов [142]. Медь необходима в митохондриях, для функционирования цитохромоксидазы, в сети Гольджи – для внеклеточных медьсодержащих белков, и в цитозоле – например, для работы супероксиддисмутазы 1. Медные металлошапероны позволяют ионам меди достигать места своей локализации в клетке без нанесения ущерба клеточным структурам. Металлошапероны способны специфически взаимодействовать исключительно со своей целью, передавая ионы меди на “родственные” им медьсодержащие белки, при этом перенос металла осуществляется предположительно за счет замещения лигандов [142].

В общем случае, встраивание ионов металла как кофактора происходит в процессе биосинтеза белка или же вскоре после этого, т.к. многие металлические кофакторы способны влиять на стабильность молекулы белка. Для ряда белков показано, что биосинтез белка и элонгация аминокислотной цепи связаны с шаперон-опосредованным фолдингом белка [143,144]. Молекулярные шапероны связывают образующиеся полипептиды и фолдируют их. В то время как в молекулы цитозольных металлопротеинов, ионы металлов встраиваются, вероятно, на данном этапе, секреторные белки или же белки строгой компартментализации (например, цитохромы), скорее всего, получают ионы меди уже после трансляции и транслокации. Внеклеточные медьсодержащие белки, передвигаясь через эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи, фолдируются и созревают. Предполагается, что встраивание меди для таких белков происходит в везикулах аппарата Гольджи [141].

Таким образом, становится понятно, что для лакказ, содержащих 4 иона меди, объединенных в 3 медных центра, должен существовать, по меньшей мере, один специфический металлошаперон, участвующий в биогенезе этого фермента. Однако более вероятной представляется гипотеза о комплексе металл-связывающих и транспортных белков-ассистентов.

Белковые факторы, участвующие в клеточном метаболизме меди являются высококонсервативными для эукариот. Медные металлошапероны гомологичные Atx1p из *Sacharomyces cerevisiae* и медь-транспортирующей АТФазам Р-типа описаны для дрожжей, млекопитающих, нематод и растительных систем [145–147]. В базидиомицете *Trametes versicolor* удалось выделить и охарактеризовать гомологи медного шаперона Atx1p [79] и АТФазы Р-типа Ccc2 [148]. Предположительный механизм их действия следующий: цитоплазматический металлошаперон связывает ионы меди и доставляет их к АТФазе Р-типа Ccc2p, локализованной в аппарате Гольджи [149]. Ccc2 переносит медь в люмен аппарата Гольджи, где далее медь встраивается во внеклеточные медьсодержащие ферменты. В работе Uldschmid с соавторами [79] выдвинуто предположение, что лакказы в первую очередь обеспечиваются медью с помощью гомолога шаперона Atx1p, но подтверждений этому не последовало. Таким образом, до сих пор остаются неизвестными основные игроки процесса встраивания меди при синтезе лакказ у грибов.

1.2.3. Посттрансляционные модификации лакказ

Высокая степень гликозилирования внеклеточных лакказ [150,151] и еще более значительное гликозилирование внутриклеточных лакказ [152] позволяет предположить, что гликозидная «оболочка» фермента играет важную роль в стабилизации структуры фермента, его секреции, а так же определяет его устойчивость к воздействиям различных факторов (внутриклеточной деградции и внеклеточному протеолизу). Подобная гипотеза подтверждается следующими результатами исследований: N-гликозилирование поддерживает структурную целостность молекулы за счет увеличения количества прочных водородных связей при образовании устойчивой вторичной структуры [153]; гликозилирование защищает вторичную структуру белка от деструкции галогенидами такими как Cl⁻ [153,154]. Среди грибных лакказ встречаются ферменты с гипергликозилированием молекул: так, например, у *Botrytis cinerea* оно достигает 49% [155], предположительно это связано с защитой фермента от тепловой денатурации. Различия в термостабильности лакказ у *Ceriporiopsis subvermispora* так же связывали с содержанием углеводов [156]. В то же время термостабильность нескольких базидиальных лакказ определялась не только высокой степенью гликозилирования [157,158], хотя показано, что негликозилированный фермент обладает не только более низкой стабильностью, но и активностью. Так, при экспрессии лакказы гриба *Trametes trogii* в штамме дрожжей *Kluveromyces lactis*, с мутациями гена Ca²⁺-АТФазы аппарата Гольджи *Klpmr1*, кодирующего белок путей O- и N- гликозилирования, активность рекомбинантного белка была значительно снижена по сравнению с нативной гликозилированной формой [159], а у дрожжей *S.*

cerevisiae и *P. pastoris* ограничением получения активного рекомбинантного фермента выступают системы гипергликозилирования, которые затрудняют фолдинг и каталитический цикл белков [160].

Для секретируемых лакказ характерно гликозилирование до 25% по 3-10 сайтам на молекулу белка (обычно из ограниченного и прогнозируемого репертуара аминокислотных последовательностей, например сайты N-гликозилирования представляют последовательность Asn-X-Thr/Ser). При этом характерная для грибов гликановая цепь состоит из разветвленных, α -сшитых цепей маннозы, связанных с аспарагиновым остатком двумя молекулами N-ацетилглюкозамина посредством трех β -связей [151]. В целом углеводная часть внеклеточных ферментов многих грибов (лигнин- и марганецпероксидазы из *T. versicolor* и *C. cinereus* [161]; лакказы из *P. ostreatus* [64]) характеризуется N-связанными, в основном высокоманнозными гликановыми цепями. Гликозилирование белков было тщательно изучено на дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) [162]), однако мало что известно об этих процессах для грибов, особенно для базидиомицетов. На основании данных по исследованию системы гликозилирования у дрожжей и структуре гликозильной части белков дрожжей и грибов предположено отсутствие гликозилтрансферазной активности в механизмах гликозилирования грибов, и невозможность дальнейшей модификации олигосахаридной цепи в более сложные структуры.

В статье Wang et al. [163] исследовалась дифференциальная экспрессия генов биогенеза лакказ у гриба белой гнили *Polyporus sp.* PG15. Авторам удалось выявить 4 гена со значительным превышением экспрессии в условиях индукции биосинтеза лакказ, и 17 генов с пониженной экспрессией. Эти гены предположительно участвуют в продукции лакказ на уровне метаболизма, сигналинга, транскрипции или пост-трансляционных модификаций. В результате авторами предложены условные схемы (в случае положительной и отрицательной регуляции) влияния этих генов на процессы синтеза фермента. В случае положительной регуляции – гены, кодирующие гомологи алкогольдегидрогеназы (за счет метаболизма этанола), миозина II (сигналинг ионов Ca^{2+}) и β -трансдучина (роль не выяснена) (рис. 5).

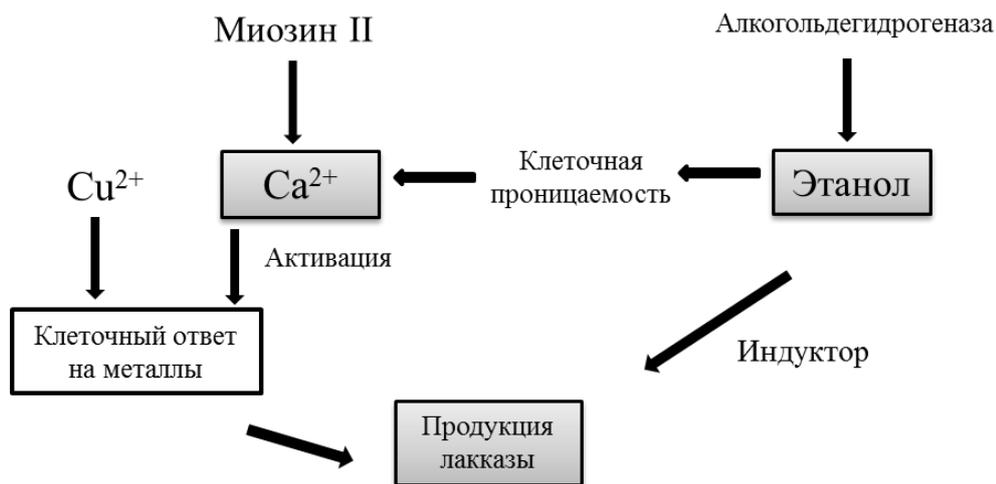


Рис. 5. Предположительная схема положительной регуляции продукции лакказ у базидиомицета *Polyporus sp. PG15*.

Отрицательная регуляция включала участие генов, кодирующих N-ацетилтрансферазу (транскрипционный репрессор), маннозо-6-фосфатазу; гены, кодирующие белки, задействованные в метаболизме - убиквитина (деградация белка); порфобилиноген-синтазы, NIPSNAР белка и MAP-киназы (участие в сигналинге и регуляции реакции организма на стресс) (рис. 6).



Рис. 6. Предположительная схема отрицательной регуляции продукции лакказ у базидиомицета *Polyporus sp. PG15*. LiP – лигнинпероксидаза.

Однако данные схемы оставляют открытыми вопросы, связанные с выявлением прямых участников процессов фолдинга (особенно в части встраивания меди) и секреции лакказ, а также транскрипционных факторов, влияющих на транскрипцию генов лакказ.

1.3. Роль базидиальных лакказ в процессах лигнинолиза и жизнедеятельности грибов

1.3.1. Характеристика базидиальных грибов рода *Trametes*

Базидиальные грибы играют особую экологическую роль, являясь одновременно симбионтами-эндофитами, обитающими на корнях, листьях и хвое растений, паразитами и патогенами растений и животных, или сапротрофами, осуществляющими деструкцию растительной лигноцеллюлозы до простых сахаров, олигосахаридов и гуминовых веществ почвы. Последнее имеет значение для цикла углерода на Земле, особенно для лесной экосистемы, где значительное количество лигноцеллюлозного сырья, образующегося при отмирании деревьев, подвергается биodeградации и модификации с помощью филаментарных грибов-возбудителей белой или бурой гнили древесины. Лигнин является потенциально богатым энергией материалом, но он не может служить единственным источником углерода и энергии, его деградация возможна лишь при наличии в среде дополнительных субстратов, например глюкозы или целлюлозы. В связи с этим деградация лигнина представляет собой процесс вторичного метаболизма и происходит, когда в среде обитания практически исчерпаны источники углерода, азота или серы [164]. Разложение лигнина – процесс окислительный, и стимулирующее действие кислорода на биodeградацию лигниновых полимеров характерно для всех грибов белой гнили. Кортикоидные базидиомицеты – основные организмы, разлагающие все компоненты лигноцеллюлозы как мягких хвойных пород деревьев, так и лиственных деревьев, включая гетерополимерные молекулы лигнина [15,16]. При этом они способны разрушать C_{α} - C_{β} , β -арил, $C1$ - C_{α} - связи, включая деградацию ароматических углерод-углеродных связей [165,166].

Полипоровые представляют собой обширную группу агарикомицетов, включающую порядка 1800 описанных видов [167]. Они являются ключевыми организмами, осуществляющими цикл углерода в природе, а представители белой гнили древесины – самые эффективные деструкторы полимеров лигнина в биосфере [11].

Грибы рода *Trametes* являются ксилотрофными базидиомицетами – возбудителями белой гнили древесины. Они обладают способностью продуцировать комплекс внеклеточных ферментов различного действия (лигнолитического, целлулолитического), что позволяет им утилизировать как труднодеградируемые природные полимеры (целлюлоза, лигнин), так и различные ксенобиотики [168,169]. Известно, что грибы этого рода обладают крайне высоким лигнолитическим потенциалом. Существующие работы показывают, что среди родов *Pycnoporus*, *Polyporus*, *Schizophyllum*, *Ganoderma*, *Trametes*, *Stereum*, *Inonotus*, *Phelinus*, *Fomes*, *Daedalea*, *Trichaptum*, *Steccherium*, *Poria*, *Chondrostereum*, *Merulius*, *Irpex*,

Hexagonia, *Ischnoderma*, *Fomitopsis* и *Cerrena* максимальным лигнолитическим потенциалом характеризуются два штамма, принадлежащие к роду *Trametes*: *T. maxima* и *T. villosa* [170].

В связи с этим все большее внимание уделяется изучению основных ферментов, входящих в состав мультиферментного комплекса грибов рода *Trametes*: полимедных оксидаз, гемсодержащих пероксидаз и др. в том числе, с точки зрения генетической организации и молекулярной биологии. На настоящий момент в базах данных присутствует частично аннотированный геном только одного представителя рода *Trametes* – *T. versicolor*, в то время как для рода *Phanerochaete* их 3, а для различных представителей дрожжей – более трех десятков (<http://genome.jgi.doe.gov>).

Способность к деградации лигноцеллюлозных субстратов базидиальными грибами напрямую связана с составом их лигнинмодифицирующей системы. Их высокий деградационный потенциал обуславливает большой интерес к этой группе грибов для использования в разложении органических отходов (уголь, лигнин, лигноцеллюлоза и т.д.) и ксенобиотиков (азокрасители, пестициды и др.). Грибы рода *Trametes* устойчивы к относительно высоким концентрациям в среде тяжелых металлов, что наделяет их потенциалом к использованию в технологиях ремедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами и другими ксенобиотиками. Например, *T. versicolor* обладает высокой устойчивостью к ионам Cd, Zn, Ni, Co, Cr, Mo, Pb, Hg и Sn [171]. При этом поглощение металлов может происходить по двум направлениям: адсорбционные процессы и активный транспорт металлов в клетки [172–174]. Продукция внеклеточных лигнолитических и целлюлолитических ферментов регулируется ионами тяжелых металлов на уровне транскрипции, а также влияет на уровень их внеклеточной активности. Способность грибов белой гнили адсорбировать и накапливать металлы, а так же механические свойства мицелия позволяют применять базидиомицеты для селективной сорбции отдельных ионов тяжелых металлов при очистке различных загрязненных сред [175,176].

На данный момент грибы рода *Trametes* широко применяются лишь в природоохранных технологиях, в основном для разложения ксенобиотиков. Расширение областей применения грибов рода *Trametes*, их использование в биокаталитических технологиях и технологиях «зеленой химии», возможно только при условии продолжения исследований по физиологии, биохимии и молекулярной организации этих базидиомицетов. Сложная организация генома, протеома и секретома базидиомицетов обеспечивает биосинтез и секрецию различных по структуре и составу сложных ферментов и позволяет рассматривать данные микроорганизмы в качестве модельной системы для экспрессии рекомбинантных белков, при этом получая на выходе уже готовый, полностью фолдированный и гликозилированный белок с необходимой структурой активного центра.

Однако для эффективного использования продуцента в промышленных целях необходимо создание мутантных штаммов и соответствующих экспрессионных (рекомбинантных) систем, позволяющих добиться высокого выхода целевого белка, что в свою очередь требует знаний не только геномной организации, но и метаболических путей синтеза и регуляции целевых ферментов, таких как лакказы и гем-содержащие пероксидазы.

1.3.2. Общая характеристика структурных и каталитических свойств лакказ базидиальных грибов

Практически все грибы-возбудители белой гнили древесины продуцируют лакказы [177,178]. Изоферментный состав комплекса может при этом изменяться в широких пределах у представителей различных таксономических и экологических групп. Уровень активности внеклеточных ферментов так же имеет существенную штаммовую и видовую вариабельность. Грибы рода *Trametes* являются одними из наиболее активных продуцентов внеклеточных оксидаз и в частности лакказ среди базидиальных грибов-возбудителей белой гнили древесины. Их изучению, связанному в первую очередь с лигнолитическим потенциалом базидиомицетов *Trametes*, посвящены работы многих авторов [179,180]. По некоторым данным [181] лакказы - одни из основных ферментов лигнолитического комплекса данного рода. Показано, что внеклеточные фенолоксидазы грибов белой гнили проявляют высокую устойчивость к инактивации и широкую специфичность по отношению к фенольным субстратам. Более того, лакказы грибов рода *Trametes* обладают значительным редокс-потенциалом иона меди T1 центра и являются высокопотенциальными ферментами (выше 710 мВ по отношению к нормальному водородному электроду) [178,182,183], а, следовательно, способны непосредственно окислять достаточно широкий спектр соединений с низким потенциалом ионизации [184].

Лакказы окисляют фенольные мономеры лигнина до феноксильных радикалов (рис. 7), которые вступают в неферментативные реакции деметоксилирования лигнина и метоксифенольных кислот, а также реакции образования хинонов или олигомерных продуктов окисления [22]. Один каталитический цикл включает в себя несколько промежуточных интермедиатов [185], и в результате 4 электрона передаются от фенольного субстрата (Phe-OH).

1. Laccase-red + O₂ → Laccase-O-O-H
2. Laccase-O-O-H + 2 H⁺ → Laccase-OH-native + H₂O
3. Laccase-OH-native → Laccase-OH-resting
4. Laccase-OH-resting + 4 Phe-OH → Laccase-red + 4 Phe-O[•] + H₂O

Рис. 7. Общая схема каталитического цикла лакказ [2].

Лакказы отличаются друг от друга каталитическими свойствами по отношению к различным субстратам, причем полный спектр потенциальных субстратов лакказ и, в особенности, спектр природных ее субстратов остается малоизученным. Более того, субстратная специфичность относительно фенольных субстратов лакказ частично перекрывается с таковой у тирозиназ. Отсутствие действия на тирозин отличает лакказы от последних, также как и общая структура белковой молекулы.

По структуре лакказы характеризуются наличием уникального по строению активного центра, в который входит ансамбль из четырех ионов меди: одного иона меди первого типа (Т1 или «голубого» центра с максимумом поглощения при 600 нм и детекцией в ЭПР спектрах), одного иона меди второго типа (Т2, детектируемый в ЭПР спектрах) и двух ионов меди третьего типа (Т3, биядерный центр с поглощением при 330 нм). Т2 и Т3 центры образуют единый медный кластер. Два гистидина и один цистеин служат в качестве лигандов для меди Т1 центра и восемь гистидинов связывают ионы меди в Т2/Т3 кластере. Мононуклеарный Т1 центр является первичным «приемником» электронов от субстрата, далее электроны переносятся на Т2/Т3 кластер, являющийся местом связывания и восстановления молекулярного кислорода до воды [186,187].

В результате множественного выравнивания последовательностей грибных лакказ удалось идентифицировать 4 консенсусных региона L1-L4, наиболее характерных для лакказ и отличающих их от других представителей ПМО [188]. Двенадцать аминокислотных остатков выступающие в ферментах в качестве лигандов ионов меди, расположены в пределах этих четырех идентифицированных консервативных областей, из которых L2 и L4 соответствуют ранее идентифицированным характеристическим последовательностям, содержащим аминокислотные лиганды координирующие ионы меди у нескольких ПМО, а L1 и L3 являются последовательностями специфическими для лакказ [188] (табл. 2).

Таблица 2. Консенсусные регионы грибных лакказ.

Характеристические медь-связывающие последовательности	
Тип I	G-X-(FYW)-X-(LIVMFYW)-X-(CST)-X8-G-(LM)-X3-(LIVMFYW)
Тип II	H-C-H-X3-H-X3-(AG)-(LM)
Консенсусные последовательности лакказ	
L1	H-W-H-G-X9-D-G-X5-QCPI
L2	G-T-X-W-Y-H-S-H-X3-Q-Y-C-X-D-G-L-X-G-X-(FLIM)
L3	H-P-X-H-L-H-G-H
L4	G-(PA)-W-X-(LFV)-HCHI-DAE-X-H-X3-G-(LMF)-X3-(LFM)

Эти области (L1 и L3) содержат 4 (6) аминокислотных остатков, непосредственно взаимодействующих с ионами меди. В зависимости от аминокислотного остатка, расположенного на расстоянии 10 аминокислот от консервативного цистеина в области L4, лакказы были разделены на 3 группы: 1 (остаток – метионин, Met), 2 (остаток – лейцин, Leu), и 3 (остаток – фенилаланин, Phe) [188]. Этот аминокислотный остаток (четвертый координирующий аксиальный лиганд T1 медного центра), как предполагается, имеет важное значение для редокс-потенциала меди T1 в актином центре фермента [154,189]: наличие Phe в этом положении обуславливает высокий окислительно-восстановительный потенциал T1 центра в лакказах грибов [190], что влияет на каталитических свойства фермента.

Недавно было показано, что структура и аминокислотный состав неконсервативных участков, находящихся в 5 областях (петлях) белковых молекул и образующих субстрат связывающий карман лакказ, играют ключевую роль при связывании субстрата. Причем, изоферменты лакказ базидиомицетов *Trametes* sp., отличающиеся по своим биохимическим свойствам и строению субстрат-связывающего кармана, имеют и различную субстратную специфичность [191,192].

Модификация лигнина лакказами может идти различными путями, в зависимости от условий реакции, и приводить к образованию продуктов с отличающимися химическими свойствами. Состав продуктов окисления лакказами модельных соединений лигнина, а также степень их полимеризации варьирует в зависимости от pH реакционной среды, температуры и концентрации фермента [33,193,194]. Например, при окислении лакказами грибов *Trametes villosa* и *Myceliophthora thermophile* ванилинового спирта образовывались различных группы продуктов: 5-5' и 5-O-4' димеры при pH 5,0 и 7,5 [193]. Было установлено, что распределение продуктов полимеризации зависело от pH среды – образование 5-5' димеров было характерно для более кислых значений pH, после чего происходило их дальнейшее окисление. А при окислении лакказой *Trametes versicolor* при значении pH 5,2 было отмечено образование ванилина и 4,4'-гидрокси-3,3'-диметокси бензофенона [195]. Возможно, модификация лигнина лакказами при различных условиях реакции приводит к активации ферментативного комплекса, отличающегося по изоферментному составу и как следствие к образованию продуктов разных по структуре и химическим свойствам.

1.3.3. Связь физиологической роли и биохимических функций лакказ, кодируемых мультигенным семейством

До недавнего времени лакказы считались вспомогательными ферментами лигнолитического комплекса из-за отсутствия их генов у *P. chrysosporium* – модельного организма, используемого для изучения деградации лигнина по типу белой гнили: для

P.chrysosporium была показана экспрессия одной ферредоксидазы Fet3-типа и нескольких неохарактеризованных ПМО [4,39]. В то же время для многих микроорганизмов отмечено присутствие в геномах мультигенных семейств, кодирующих лакказы, а так же значительные уровни продукции изоферментов при культивировании грибов в различных условиях. Например, сапротрофный гриб *C. cinerea* обладает в общей сложности 17 различными генами, относящимися к двум эволюционным ветвям лакказ [196]. Геном гриба *Laccaria bicolor* содержит 9 лакказ из 11 генов, относящихся к ПМО [53], а для базидиомицета белой гнили *Pleurotus ostreatus* были предсказаны 12 генов лакказ *sensu stricto* [62]. В целом для родов эффективных лигнолитиков, включающих представителей грибов-возбудителей белой гнили древесины, таких как *Pleurotus* [61,197] и *Trametes* [198,199], характерна транскрипция сразу нескольких генов лакказ в зависимости от условий роста, а так же продукция большого числа изоформ лакказ [2]. Учитывая сложность организации генного семейства лакказ, предполагается, что паралоги базидиальных лакказ различаются по своим физиологическим функциям [31,60,200]. Подобное генетическое многообразие среди лакказ может быть следствием независимых событий дупликации-дивергенции в ходе эволюции [201].

Полифункциональность лакказ определяется их способностью окислять значительный спектр субстратов, который может быть расширен при использовании медиаторов - низкомолекулярных легкоокисляемых соединений [202]. Проведенный рядом авторов филогенетический анализ аминокислотных последовательностей лакказ показал их распределение по функциональным кластерам, при этом ферменты внутри одного кластера характеризуются общностью физико-химических и биохимических свойств. В связи с этим, предполагается, что изоферменты лакказ из различных кластеров, найденные у аскомицетов и базидиомицетов выполняют схожие биологические функции [30,31,158].

Существующие попытки кластеризации грибных лакказ позволили выделить два подсемейства внутри семейства лакказ *sensu stricto* [31]. В более обширное подсемейство 1, входит большинство идентифицированных лакказ, за исключением двух отдельных ферментов *S. commune*. Подсемейство 2 включает в себя всего 3 фермента, два из которых – Lcc16 и Lcc17 из гриба *C.cinerea*, последовательности которых достаточно близки. Подсемейство 1 так же разделено на отдельные кластеры, причем включение в анализ лакказ из грибов-возбудителей белой гнили древесины приводило к четкой кластеризации подсемейства 1 в зависимости от деградируемых субстратов (древесные, солома или органические отходы) [31]. Так для грибов рода *Trametes* была показана индукция транскрипции изоферментов лакказ на различных этапах роста продуктами деградации лигнина (напр. вератрового спирта), в то время, как другие гены экспрессировались на прежнем уровне [31]. Выравнивание последовательностей 10 лакказ *T. versicolor*

(идентичность последовательностей 68-99%), забанкированных в базе данных Genebank, показало, что они образуют 4 независимых кластера [199]. Позже в работе [158] было показано, что лакказы *T. versicolor* из различных кластеров отличаются между собой и по биохимическим свойствам. Показано, что изоферменты лакказ, относящиеся к разным кластерам, не только отличаются по своим биохимическим свойствам и строению субстрат-связывающего кармана, но также имеют различную субстратную специфичность [203].

Обычно, базидиомицеты продуцируют основную конститутивную форму фермента, которая детектируется при любых условиях культивирования. В то же время другие изоферменты лакказ индуцируются в определенных условиях культивирования и при добавлении определенного индуктора. Так, например, из трех изоферментов базидиомицета *Trametes* sp. AN28-2, лакказа LacA детектируется в присутствии всех протестированных индукторов, LacB наиболее сильно индуцируется 3,5-дигидрокситолуолом, LacC не детектировалась в присутствии органических индукторов, но ее экспрессия наблюдалась при ко-культивировании с аскомицетом *Trichoderma* sp. ZH1 [80,204]. Аналогичная картина дифференциальной экспрессии генов лакказ характерна и для других базидиомицетов [205–208].

Базидиомицеты в значительной степени отличаются по количеству представителей и составу семейства полимедных оксидаз. Полученные на настоящий момент данные позволяют предположить, что подобная вариабельность связана с экологической нишей и образом жизни конкретного вида. Для подтверждения или опровержения этой гипотезы необходим анализ данных полногеномного секвенирования организмов, вкупе с транскриптомными и протеомными данными. В то же время одна из основных задач, стоящих перед исследователями, заключается в определении индивидуальных функций отдельных ферментов лакказного семейства и установлении функционально-структурных закономерностей внутри мультигенного семейства ПМО и лакказ в частности.

В заключении стоит отметить, что, не смотря на долгую историю изучения и значительный объем полученных данных, до сих пор не существует четкого понимания механизма биогенеза лакказ у базидиальных грибов. Отдельные данные позволяют предположить потенциальных участников этого процесса (белки секреторного пути, молекулярные шапероны, транскрипционные факторы и проч.), но объединить их в общую картину на данный момент невозможно. Мультигенное семейство лакказ обладает тонкой системой регуляции на уровне транскрипции генов и продукции изоферментов и изоформ. Четкое функционирование молекулярных механизмов регуляции биогенеза посредством различных *cis*-действующих элементов при транскрипции, а также через системы

посттрансляционной модификации и секреции готовой белковой молекулы, обеспечивает реализацию всех биологических функций фермента у грибов.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Штамм микроорганизма (объект исследования)

В работе использовали штамм-продуцент лакказы *Trametes hirsuta* 072 (*Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilat, 1939) семейства Polyporaceae из коллекции культур ФГБУН Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (ЛЕБИН) [209].

2.2. Реагенты

- Все используемые в работе реактивы имели чистоту «хч», «осч» и «Analyticalgrade».
 - Для культивирования базидиомицета использовали отечественные реактивы: глюкоза, пептон, KH_2PO_4 , $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 и CaCl_2 ;
 - В работе использовали кислоты и щелочи фирм Merck (Германия); Sigma (США);
 - Для определения ферментативных активностей в качестве субстратов использовали: пирокатехин, синингалдазин, MnSO_4 и вератровый спирт (Sigma, США);
 - Реактивы для экстракции и осаждения внутриклеточных и внеклеточных белков – трихлоруксусная кислота (Sigma, США), ацетон (Химмед, Россия), метанол, хлороформ (Химмед, Россия), Tris-HCl (Merck, Германия), ЭДТА (Sigma, США);
 - Для измерения концентрации белка в образцах – Coomassie protein assay reagent (Pierce, США);
 - Реактивы для белковых электрофорезов и изоэлектрофокусирования фирм — Sigma (США), GEHealthcare (США), ServaElectrophoresis (Германия); Applichem (Германия), BioRad (США);
 - Реактивы для окраски электрофореграмм – тиосульфат натрия, карбонат натрия, формальдегид, Brilliant BlueR staining Solution (Sigma, США); серебро азотнокислое (Химмед, Россия);
 - При проведении масс-спектрометрического анализа белков использовали NH_4HCO_3 (Sigma, США), модифицированного трипсина (Promega, США), 2,5-дигидроксибензойную кислоту (Aldrich, США) и трифторуксусную кислоту (Sigma, США);
 - Белковые маркеры для электрофореза фирм — BioRad (США) и Fermentas (США) PageRuler™ Prestained Protein Ladder;
- Для работы с нуклеиновыми кислотами применяли следующие реактивы и наборы:
- Реактив TRIzol Reagent (TriPure Isolation Reagent) для выделения тотальной РНК фирмы Invitrogen (Великобритания). Дополнительная очистка образцов проводилась с помощью набора QIAGEN RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, USA);
 - Синтез первой цепи кДНК на РНК-матрице - набор MMLV RT KIT (Евроген);

- Для процедуры супрессионной вычитающей гибридизации кДНК - 50X Advantage DNA Polymerase mix (Advantage 2 PCRkit и Polymerase mixes, BD Biosciences Clontech, США), а так же праймеры и адаптеры (Евроген, Россия), эндонуклеаза рестрикции *RsaI* (Promega, США).

- Праймеры для ПЦР, синтезированные фирмой Евроген (Россия).

- Для ПЦР амплификации фрагментов кДНК - Taq-полимераза 5,0 ед/мкл, эквимольная смесь четырех dNTP по 500 мкМ каждого и 5-кратный ПЦР-буфер, Евроген, Россия);

- Для количественной ПЦР в реальном времени - готовая смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+ROX (Евроген, Россия);

- Для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле - Агароза (Applichem, Германия) и ДНК-маркеры O'GeneRuler DNA Ladder Mix фирмы Fermentas (США).

2.3. Культивирование базидиомицета *T. hirsuta* на средах различного состава

2.3.1. Прекультивирование микроорганизма

Штаммы хранили на агаризованных косяках, которые готовили путем разбавления суслу водой в объемном соотношении 1:4 с добавлением 2% агара при температуре +4°C. Культуру хранили без пересева от 6 мес. до одного года без потери биосинтетической активности. Выращивание посевного материала проводили поверхностным способом на питательной среде с начальным значением pH 6,0 при 25-27°C в темной аэрируемой камере. Во всех экспериментах для выращивания инокулята использовали среду следующего состава (г/л): глюкоза - 10,0; пептон - 3,0; KH_2PO_4 - 0,6; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; K_2HPO_4 - 0,4; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0005; MnSO_4 0,05; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5, CaCl_2 0,25 [210]. При выращивании посевного материала в колбу объемом 750 мл, содержащую керамические бусы и 200 мл питательной среды, вносили кусочки мицелия с агарового косяка и инкубировали при 26-28°C в течение 6-8 сут. Перед дальнейшим посевом на исследуемые среды посевной материал измельчали керамическими бусами.

2.3.2. Жидкофазное культивирование на синтетических средах

Глубинное жидкофазное культивирование гриба *T. hirsuta* проводили на следующих средах: глюкозо-пептонной среде (ГП) (г/л: глюкоза -10,0; пептон- 3,0; KH_2PO_4 - 0,6; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; K_2HPO_4 - 0,4; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0005; $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; CaCl_2 - 0,25; pH 6,0), глюкозо-пептонной среде вышеуказанного состава с внесением индуктора биосинтеза лакказ CuSO_4 - 0,25 г/л, (ГП/ Cu^{2+}); глюкозо-пептонной среде вышеуказанного состава с внесением растворимого лигнина – 2 г/л, (ГП/AL).

Перед посевом среды **ГП**, **ГП/Cu²⁺** и **ГП/AL** автоклавировали при 120°C и 1 атм. в течение 30 мин. В колбы объемом 750 мл вносили 200 мл питательной среды и 20 мл инокулята гриба, получаемого согласно п.2.3.1. Жидкофазное глубинное культивирование проводили при постоянном перемешивании (180 об/мин), при температуре 27-28°C в темной аэрируемой камере.

2.3.3. Жидкофазное культивирование на лигноцеллюлозном субстрате

В случае моделирования природных условий роста базидиомицета на лигноцеллюлозном субстрате, проводили стационарное поверхностное культивирование *T.hirsuta*. Для этого готовили среды, содержащие лигноцеллюлозный материал: стандартная **ГП** среда с внесением овсяной соломы (50 г/л) – без индуктора (**ЛЩ**) и с индуктором биосинтеза лакказ - 0,25 г/л CuSO₄, (**ЛЩ/Cu²⁺**). Культивирование проводили в колбах объемом 750 мл, куда вносили 200 мл питательной среды. При проведении экспериментов в качестве контроля использовали стационарное культивирование на **ГП** среде без индуктора. Среда перед посевом автоклавировали при 120°C и 1 атм. в течение 40 мин. Посевной материал, полученный согласно п. 2.3.1, вносили в количестве 20 мл на колбу для культивирования. Для отделения мицелия от культуральной жидкости после окончания культивирования, на поверхность среды помещали стерильные сетки. Культивирование осуществляли при температуре 27-28°C в темной аэрируемой камере. Опыт проводили в трех биологических повторностях.

2.3.4. Изучение динамики биомассы в процессе культивирования *T.hirsuta*

Воздушно-сухую биомассу определяли весовым методом [211], высушиванием образцов мицелия при 105°C до постоянного веса в тиглях, предварительно доведенных до постоянной массы.

2.4. Исследование секретома *T. hirsuta*

2.4.1. Изучение динамики активностей ферментов лигнинмодифицирующего комплекса *T.hirsuta*

Определение активности лакказы

Активность лакказы (Lac) определяли спектрофотометрическим методом, используя в качестве хромогенного субстрата раствор сингалдазина (Sigma, USA; $\epsilon_{520} = 65,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Реакционная смесь включала в себя 0.42 мМ сингалдазин в 0,1 М Na-ацетатном буферном растворе, pH 4.5 (общий объем смеси составлял 2 мл) и соответствующее количество культуральной жидкости. Изменение оптической плотности измеряли при 520 нм в течение 3 минут [212].

Определение активности марганец-зависимой пероксидазы

Активность марганец пероксидазы (MnP) определяли, измеряя образование Mn^{3+} -тарtratного комплекса ($\epsilon_{238} = 6500 M^{-1}cm^{-1}$) при окислении 0.1 mM $MnSO_4$. Реакционная смесь (2 мл) состояла из 0.1 mM $MnSO_4$ в 0.1 M Na-тарtratном буферном растворе, pH 5,0, а так же 0.1 mM H_2O_2 в качестве второго субстрата. Ферментативную кинетику измеряли 3 минуты, контролируя увеличение поглощения при 238 нм [213].

Определение активности марганец-независимой пероксидазы

Активность марганец-независимой пероксидазы (VP) определяли, используя в качестве субстрата вератровый спирт ($\epsilon_{310} = 9300 M^{-1}cm^{-1}$). При этом фиксировали образование вератрового альдегида при длине волны 310 нм. Реакционная смесь (2 мл) включала в себя 2мM вератрового спирта в 0.1 M Na-тарtratном буферном растворе, pH3.0 и 0.1 mM H_2O_2 . Ферментативную кинетику измеряли в течение 3 минут.

Определение активности лигнинпероксидазы

Активность лигнинпероксидазы (LiP) измеряли аналогично измерению VP, но при большей концентрации вератрового спирта (8 mM) и менее кислом pH (pH 4.5) [214].

Определение активности арилалкогольоксидазы

Активность арилалкогольоксидазы (AAO) измеряли по детектированию образования вератрового альдегида при окислении вератрового спирта. Реакционная смесь (2 мл) содержала 5 mM вератрового спирта в 0.1 M Na-фосфатном буферном растворе, pH 6.0. Ферментативную кинетику измеряли 3 минуты, контролируя увеличение поглощения при 310 нм [215].

За единицу активности (U) принимали количество фермента, обеспечивающее окисление 1 мкM субстрата в 1 мл реакционной смеси за 1 мин или же количество фермента, осуществляющего выработку 1 мкM соответствующего продукта в минуту. Для анализа использовали спектрофотометр PerkinElmer (США). Все измерения проводили в трех повторностях и рассчитывали средние значения.

2.4.2. Оптимизация условий пробоподготовки образцов внеклеточных белков для протеомных исследований

Перед осаждением белков, культуральную жидкость (КЖ) *T.hirsuta* концентрировали (в 10 раз) и обессоливали при помощи системы ультрафильтрации в тангенциальном потоке, используя мембрану с отсечением 5кДа (Pellicon® XLDevice, Biomax 5 membrane, Millipore, USA).

Выделение белков с помощью смеси метанол/хлороформ

Осаждение белков проводили методом, описанным у Wessel [216]. Для этого к 20 мл культуральной жидкости (КЖ) добавляли смесь хлороформа и метанола (соотношение КЖ: метанол: хлороформ: H₂O - 1:4:1:3). После перемешивания, образцы инкубировали 5 минут при 4°C и центрифугировали (9 000g, 4°C, 2 мин). Водную фазу удаляли, не нарушая межфазной границы, и вновь приливали 4 объема метанола. Затем образцы инкубировали при 4°C в течение 5 мин и белки осаждали центрифугированием (2 000 g, 4°C, 15 мин). Полученную белковую пеллету сушили на воздухе в течение 5 мин и хранили при -70°C до дальнейшего использования.

Модифицированный метод выделения белков смесью метанол/хлороформ

Перед осаждением, образец был дополнительно сконцентрирован с помощью диализа против 70% раствора глицерина в K₂HPO₄ (30 mM, pH 7.5, v/v) при 4°C в течение ночи [217]. Далее проводили осаждение центрифугированием, как описано выше для стандартного метода экстракции смесью метанол/хлороформ.

Выделение белков с помощью ацетона

Для осаждения белков ледяной ацетон и КЖ смешивали в соотношении 4:1 (v/v) и после инкубации при -20°C в течение ночи центрифугировали (20 мин, 2 000 g, 4°C). Белковый осадок промывали охлажденным ацетоном и подсушивали на воздухе [218]. Хранили пеллеты при -70°C до дальнейшего использования

Выделение белков с помощью смеси ацетон-ТХУ

Белки осаждали смесью 13,3% трихлоруксусной кислоты (ТХУ)/ 0,093% β-меркаптоэтанола в ацетоне (соотношение образец/осадитель 1:1) в течение 12 часов при температуре -20°C [219]. Осадок центрифугировали (20 минут, 2 000 g, 4°C) и дважды промывали 0,07% раствором β-меркаптоэтанола в ацетоне. Для удаления остатков растворителя, осадок подсушивали на воздухе в течение 5 минут при 20°C.

В качестве дополнительного этапа очистки экстракта белковый осадок растворяли в буферном растворе 0,05 M Tris-HCl (pH 6.8), и переосаждали белки с помощью коммерческого набора 2D Protein Kit (Bio-Rad, USA) согласно инструкциям производителя.

После экстракции и осаждения полученный осадок растворяли в лизис-буфере (1% Дитиотреитол (DTT); 4% CHAPS; 7 M мочевины; 2 M тиомочевина; 5% амфолиты 3/10) и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин при 20°C. После обработки реакцию смесь инкубировали в течение часа при 20°C и затем центрифугировали 5 мин при 13400 об/мин. Супернатант собирали и использовали для дальнейших исследований (2D-электрофорез и масс-спектрометрическая идентификация).

2.4.3. Двумерный электрофорез (2-DE) белков

2-DE электрофорез проводили по методике, описанной в [220] на системе PROTEAN^{Xi} 2-DCell (Bio-Rad, США).

При проведении изоэлектрофокусирования градиент pH составлял: от 3 до 10 (в случае внутриклеточных белков - 3-6). Количество образца составляло 150-200 мкг белка на трубку. Изофокусирование проводили в течение 16 часов при следующих режимах: 100В – 45 мин, 200В – 45 мин, 300В – 45 мин, 400В – 45 мин, 500В – 45 мин, 600В – 45 мин, 700В – 10 ч, 900В – 1,5 ч.

Последующий электрофорез полученных после изоэлектрофокусирования образцов проводили в градиентном акриламидном ДДС-геле (7,5 – 25%) при напряжении 300 В. Перед нанесением образцы инкубировали 15 мин в растворе, содержащем дитиотреитол (6 М мочевины, 2% ДДС-Na, 10 мМ DTT, 0,5 М TRIS-HCl, pH6,8) для предотвращения окисления сульфгидрильных групп в белках. Для визуального анализа распределения белковых компонентов гели окрашивали азотнокислым серебром, а для масс-спектрометрического анализа – раствором Brilliant Blue R Staining Solution (Sigma, США).

Для получения белковых карт, использовали систему геля документирования Infinity1000/26MX (VilberLourmat). Анализ белковых карт проводили при помощи ПО ImageMaster 2D Platinum, v.7 («GE Healthcare», США).

2.4.4. Масс-спектрометрическая идентификация белков

Для масс-спектрометрического анализа вырезали кусочки геля размером 3-4 мм³, соответствующие белковым пятнам, и дважды промывали для удаления красителя в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0,1 М NH₄HCO₃ в течение 20 мин при 37°C. После удаления раствора, добавляли 100 мкл ацетонитрила для дегидратации геля. После удаления ацетонитрила и высушивания геля, добавляли раствор модифицированного трипсина в 0,05 М NH₄HCO₃ с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 8 ч при 37°C, затем к раствору добавляли 0,5 % ТФУ в 10 % растворе водного ацетонитрила. Надгелевый раствор, содержащий гидролизат белка, использовали для масс-спектрометрического анализа. В качестве матрицы использовали раствор 2,5-дигидроксибензойной кислоты (10 мг/мл в 20 % водном ацетонитриле, 0,5% ТФУ)

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,005% (50ppm). Спектры получали в диапазоне масс 700-4500 m/z, выбирая мощность лазера оптимальную для

достижения наилучшего разрешения. Для получения спектров фрагментации использовали тандемный режим прибора, точность измерения фрагментных ионов была не ниже 1 Да. Для повышения уровня идентификации белков так же был использован другой метод - секвенирование de novo отдельных пептидов по спектрам их фрагментации. Проведенное секвенирование пептидов белкового образца №1 в диапазоне молекулярных масс 1000-3500 Да позволило получить отдельные пептиды, а также провести их дальнейшую идентификацию при помощи BLAST-р.

Обработку масс-спектров осуществляли с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (BrukerDaltonics, Германия). Идентификацию белков проводили при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Для этого, используя опцию «пептидный фингерпринт», провели поиск в базе данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) среди белков всех организмов с указанной выше точностью, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом геля. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >83 в базе данных NCBI считали определенными надежно ($p < 0.05$), белки, имеющие параметр достоверности score >50 считали вероятными. С использованием программного обеспечения Biotoools 3.2 (BrukerDaltonics, Германия) проводили поиск по объединенным MS+MS/MS результатам.

2.5. Исследование протеома *T. hirsuta*

2.5.1. Оптимизация условий пробоподготовки образцов внутриклеточных белков для протеомных исследований

Перед выделением внутриклеточных белков мицелий гриба фильтровали через капроновый фильтр, промывали охлажденной деионизованной водой, высушивали при помощи фильтровальной бумаги. Разрушение мицелия *T. hirsuta* для получения экстрактов внутриклеточных белков проводили в жидком азоте (в предварительно охлажденной ступке) в течение 5 мин или гомогенизатором Поттера при температуре 4°C в течение 5 мин.

Экстракцию проводили буферным раствором следующего состава: 0,05 М Tris-HCl pH 6,8 с добавлением 2 мМ ЭДТА. Полученные гомогенаты центрифугировали 20 мин при 4400 об/мин. Белки, содержащиеся в супернатанте осаждали смесью ацетон/13,3% трихлоруксусная кислота (ТХУ)/ 0,093% β-меркаптоэтанол (соотношение образец:осадитель - 1:1) в течение 12 ч при $t = -20^{\circ}\text{C}$. Осадок отделяли центрифугированием (15 мин, 4400 об/мин) и дважды промывали 0,07% β-меркаптоэтанолом в ацетоне. Для удаления остатков растворителя осадок подсушивали 5 минут при 20°C в потоке воздуха. Полученный осадок растворяли в лизис-буфере (1% Дитиотреитол (DTT); 4% CHAPS; 7М мочевины; 2М тиомочевина; 5% амфолиты 3/10) и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин при 20°C.

После обработки реакционную смесь инкубировали в течение часа при 20°C и затем центрифугировали 5 мин при 13400 об/мин. Супернатант собирали и использовали для дальнейших исследований.

Идентификацию белков проводили как описано выше (пп. 2.4.3. и 2.4.4.)

2.6. Исследование транскриптома *T. hirsuta*

2.6.1. Выделение нуклеиновых кислот (суммарной РНК)

Экстракцию суммарной РНК из мицелия *T. hirsuta* осуществляли с использованием реактива —TRIzolReagent (Lifetechnologies, USA), согласно инструкции производителя. Экстракцию проводили из свежего биологического материала, предварительно гомогенизированного или же растертого в ступке в жидком азоте. Дополнительно, препараты суммарной РНК очищали с помощью набора QIAGEN RNeasyMinEluteCleanupKit (Qiagen, USA). Полученную РНК растворяли в 50 мкл деионизованной воды, свободной от РНКаз, и хранили при – 80°C.

Целостность и количество полученных препаратов РНК определяли электрофоретически (в 1% агарозном геле), а так же по соотношению поглощения 260/280 нм и 260/230 нм на спектрофотометре UV–Visspectrophotometer (Nanodrop ND-1000, LabTechInternational, ES, UK).

2.6.2. Синтез первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) на РНК-матрице

Для процедуры супрессионной вычитающей гибридизации синтез кДНК из образцов суммарной РНК проводили по методу SMART [221]. Для синтеза первой цепи кДНК использованы праймеры SMART Oligo II и CDS primer (табл. 3) и 0,5 мкг суммарной РНК. Реакцию проводили в объеме 10 мкл. Для синтеза второй цепи кДНК в качестве матрицы использовали 1 мкл амплификата, содержащего первую цепь кДНК, после предварительного пятикратного разбавления, и праймеры SMART PCR primer (таблица 3). Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: 95°C – 10 сек; 65.5°C - 20 сек; 72°C - 3 мин, общее число циклов - 21. Далее был проведен гидролиз образцов кДНК эндонуклеазой рестрикции RsaI (Promega, США) согласно рекомендации фирмы-изготовителя.

комплиментарных внешней части супрессионных адаптеров, происходит экспоненциальная амплификация гетерогибридов трейсер-трейсер – фракции, обогащенной специфическими только доля трейсера молекулами [222,223]. Принципиальная схема проведения процедуры SSH представлена на рисунке 1.

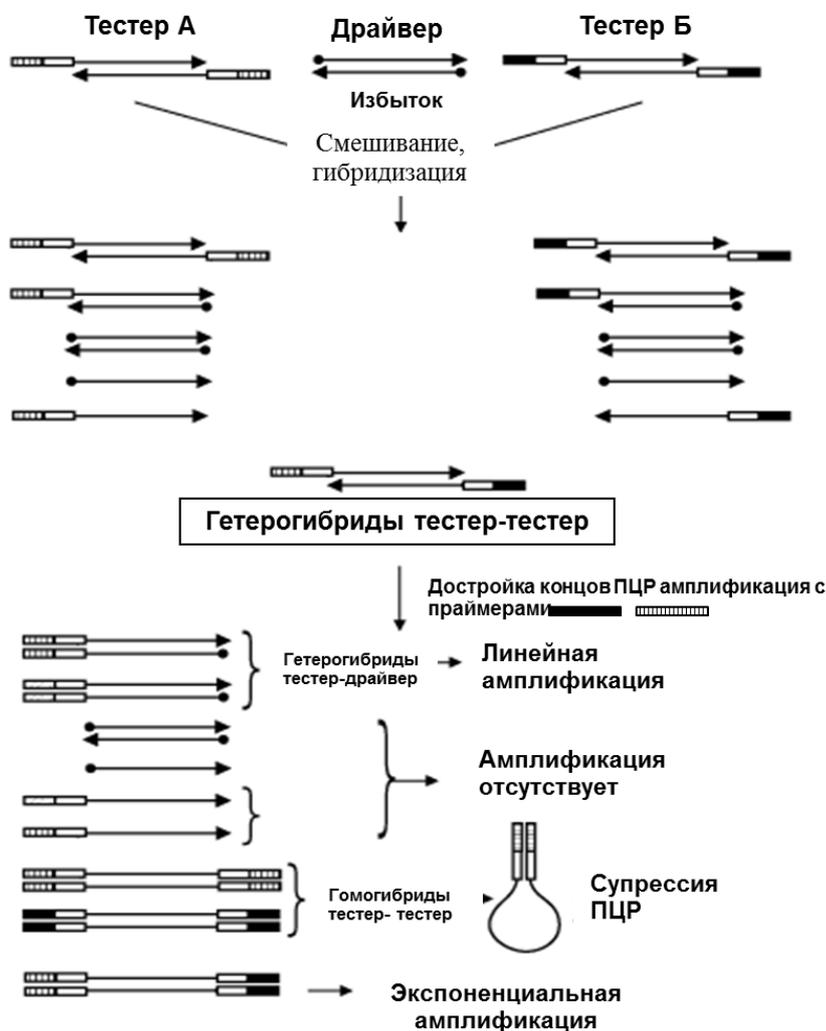


Рис. 8. Принципиальная схема проведения процедуры SSH [222].

Вычитание образцов кДНК проводили в двух направлениях: ГП/Cu²⁺ vs ГП и ГП vs ГП/Cu²⁺, где ГП/Cu²⁺- образец, полученный из мицелия базидиального гриба, образующегося при культивировании в присутствии индуктора (ионов меди), а ГП - образец, полученный из мицелия базидиального гриба, образующегося при культивировании в отсутствии индуктора (ионов меди). Для каждого направления были сконструированы две тестовые популяции за счет лигирования с адаптерами Adapters 1 и 2R (таблица 3). Эти тестовые популяции в двух пробирках были смешаны с 30-ти кратным избытком кДНК не имеющих адаптеры, обозначаемые как драйвер кДНК, за счет последовательных процедур денатурации-ренатурации ДНК. После первого раунда гибридизации, эти два образца были

смешаны и проведена их совместная гибридизация. Вычтенные библиотеки кДНК были амплифицированы за счет первичной и вторичной ПЦР. Первичная ПЦР проведена для каждого вычтенного образца кДНК (ГП/ Cu^{2+} и ГП) с использованием праймера PCR Primer 1 (таблица 3) в следующих условиях: 95°C – 10 сек; 65°C - 30 сек; 72°C - 1,5 мин, общее число циклов - 27. Вторичная ПЦР проведена для каждого вычтенного образца кДНК (ГП/ Cu^{2+} и ГП) с использованием праймеров Nestedprimer 1 и Nestedprimer2R (таблица 3) в следующих условиях: 95°C – 10 сек; 68°C - 30 сек; 72°C - 1,5 мин, общее число циклов - 10.

2.6.4. Зеркально-ориентированная селекция образцов кДНК

Для каждого вычтенного образца кДНК (ГП и ГП/ Cu^{2+}) проведена зеркально-ориентированная селекция (MOS) – процедура, позволяющая снизить количество фоновых клонов в библиотеках кДНК, полученных после супрессионной вычитающей гибридизации, и, таким образом, избежать ложноположительных результатов при секвенировании. Метод основан на том, что после ПЦР каждый вид фоновых молекул ориентирован относительно адаптера только в одном направлении, которое соответствует ориентации молекулы-предшественника. В то же время фрагменты целевых молекул кДНК участвуют в ПЦР-амплификации из-за эффективного обогащения в процессе SSH. В результате, каждая такая последовательность имеет множество предшественников и представлена в библиотеках в обоих направлениях ориентаций фрагментов.

Процедура включает в себя удаление одного из адаптеров (например, адаптер В, рис. 9) эндонуклеазой рестрикции, тепловой денатурации и повторной реассоциации. Некоторые из вновь образованных гибридов целевых кДНК несут адаптер А на обоих концах. Такие молекулы образуются в результате гибридизации молекул с зеркальной ориентации адаптеров А и В, и могут быть получены только из целевой фракции кДНК. Далее, 3'-концы заполняются и проводится ПЦР с праймером, соответствующим последовательности адаптера А. На этом этапе только молекулы, несущие адаптер А на обоих концах, нарабатываются экспоненциально. Таким образом, конечный продукт ПЦР обогащен целевыми последовательностями кДНК образцов [224].

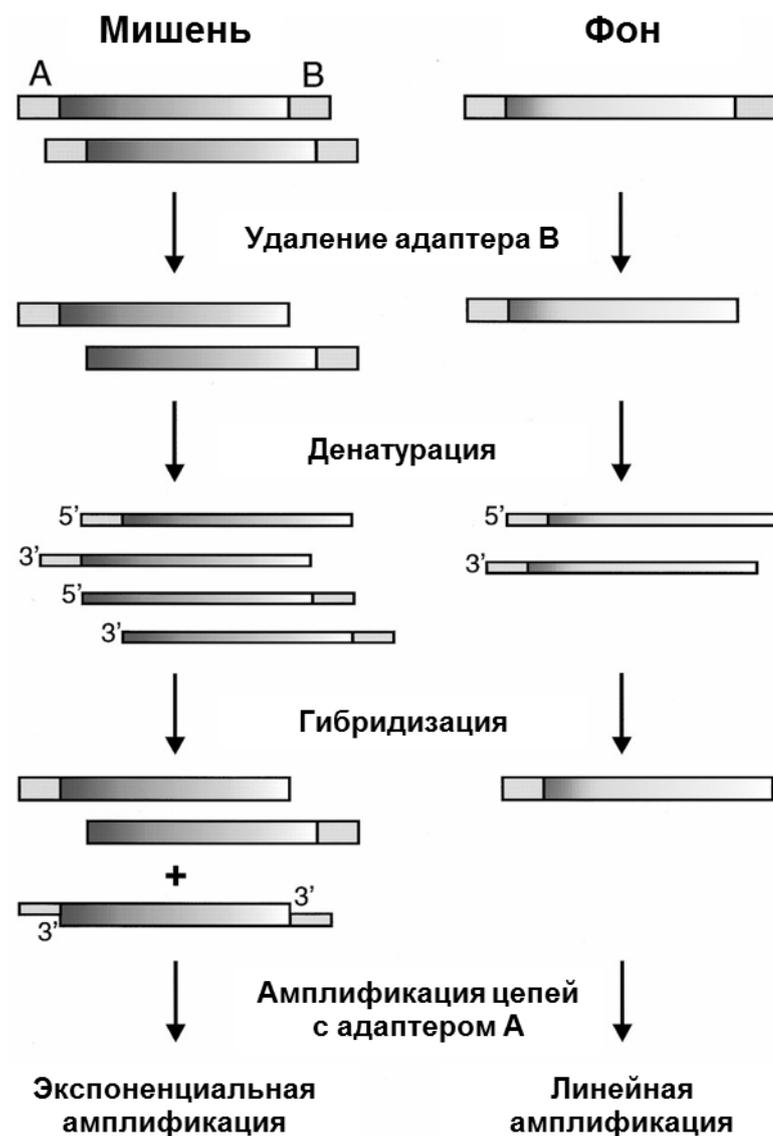


Рис. 9. Принцип метода зеркально-ориентированной селекции образцов кДНК (MOS)
[224].

Для удаления адаптера 1,5 мкл образца кДНК смешали с 2 мкл 10×*Xma*I буфера (Thermo Fisher Scientific, США), 12 мкл H₂O и 1 мкл рестриктазы *Xma*I (10 U/мкл). Реакцию термостатировали при 37°C в течение 1 часа. После чего фермент инактивировали 2 мкл 200 ммоль ЭДТА и выдерживали при 70°C 10 мин. Далее смесь инкубировали в гибридизационном буфере (2 М NaCl, 200 mM HEPES pH 8,3, 0,8 mM EDTA) при 98°C в течение 1,5 мин и при 68°C в течение 3 часов. Образцы разбавляли буферным раствором (50 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 8,3, 0,2 mM EDTA), нагревали при 70°C 7 мин, после чего проводили ПЦР.

Для исследуемых образцов MOS проводили с использованием праймера MOSPCRPrimer (таблица 3) в следующих условиях: 95°C – 10 сек; 62°C - 30 сек; 72°C - 1,5 мин, общее число циклов - 22.

2.6.5. Высокопроизводительное секвенирование образцов

Широкоформатное параллельное секвенирование вычтенных образцов кДНК проведено для 4 библиотек кДНК (ГП и ГП/Cu²⁺ до и после зеркально-ориентированной селекции) на платформе Illumina HiSeq 2000 согласно рекомендациям фирмы-изготовителя прибора. После удаления адаптеров и низкокачественных прочтений сборку транскриптов проводили с использованием программного обеспечения “Trinity” (version trinityrnaseq - 2012-03-17) согласно рекомендациям разработчиков [225]. Качество сборки оценивали с помощью анализа распределения длин при помощи скриптов Perl.

В результате, две полученные библиотеки после SSH («SSH-Cu-» и «SSH-Cu +») были использованы для сравнительного анализа профилей транскрипции *T. hirsuta*, и четыре библиотеки после SSH и MOS («SSH-Cu-» и «SSH-Cu +» и «MOS-Cu-» and «MOS-Cu +») – для поиска последовательностей лакказ.

2.6.6. Анализ результатов супрессионной вычитающей гибридизации кДНК

Полученные нуклеотидные последовательности транслировались в аминокислотные с помощью биоинформатического портала EXPASY (<http://www.expasy.org/>) в трех рамках считывания в обоих направлениях. Поиск продуктов генов осуществляли по базам данных NCBI с помощью алгоритмов BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Функциональная аннотация в терминах генной онтологии (GO) и баз данных KEGG и анализ данных проведены с использованием программного обеспечения Blast2go (<http://www.blast2go.org/>).

2.6.7. Дизайн праймеров для ПЦР

В ходе работы был сконструирован ряд праймеров, необходимых для получения полноразмерных последовательностей лакказ или проведения количественной оценки транскрипции. Дизайн и анализ праймеров осуществляли с помощью ПО Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Последовательности праймеров представлены в таблице 4.

Таблица 4. Последовательности геноспецифических праймеров (олигонуклеотидов), использованных в работе. qPCR – количественная ПЦР в реальном времени, seq – амплификация ПЦР-продукта для секвенирования, RACE – для быстрой амплификации концов кДНК.

	Название гена		Последовательность	Назначение праймера	
1	α-Актин	Forward	5'-GAYATGGARAAGATYTGG-3'		seq
		Reverse	5'-TTYTCCTTGATGTCRCG-3'		seq
		Forward	5'-ACGTACAАСТCGATCTACAAGTG-3'	qPCR	
		Reverse	5'-TCCTTCTGCTTACGGTCCGCAATACC-3'	qPCR	
2	β-Тубулин	Forward	5'-GGGCYAAGGGTYAYTAYAC -3'		seq
		Reverse	5'- GGRATCCAYTCRACRAA -3'		seq
		Forward	5'-CCTCAACCTCCTTCATC-3'	qPCR	
		Reverse	5'-CTCGTCTCCACTTCTTC-3'	qPCR	
3	Лакказа А	l1_3`-1	5'-ACCCAACGACCCTCACAА-3'		RACE
		l1_3`-2	5'-TACGACCACCAACACGGA-3'	qPCR	RACE
		l1_5`-1	5'-TCGTGGTTGTCGATGCTG-3'		RACE
		l1_5`-2	5'-CGCACGACAАAGAGACAА-3'	qPCR	RACE
4	Лакказа В	l2_3`-1	5'-GAAACCCTACCGCACAA-3'		RACE
		l2_3`-2	5'-ATCCAАACCACACATTСAG-3'	qPCR	RACE
		l2_5`-1	5'-ACGGGTTGGTTGGCATTС-3'		RACE
		l2_5`-2	5'-ACGGTGAGAGGTTTGCTA-3'	qPCR	RACE
5	Лакказа С	l3_3`-1	5'-ТАACAGCACGAACCTCAC-3'		RACE
		l3_3`-2	5'-AGTCGAGCAAGGAAAGCGG-3'		RACE
		l35_5`-1	5'-ATATCTTGTTСGCGGTG-3'		RACE
		l3_5`-2	5'-AGAGCGAAACTAAGCGGA-3'		RACE
6	Лакказа D	l4_3`-1	5'-TGCGGCAACAGTACAGA-3'	qPCR	RACE
		l4_3`-2	5'-TTCCGCCTCGTCTCTCT-3'		RACE
		l4_5`-1	5'-GCTGTCCTGCGTAGATTT-3'		RACE
		l4_5`-2	5'-GAGAGAGAGACGAGGCGGAAA-3'	qPCR	RACE
6	Лакказа E	l4_3`-1	5'-TGCGGCAACAGTACAGA-3'	qPCR	RACE
		l4_3`-2	5'-TTCCGCCTCGTCTCTCT-3'		RACE
		l4_5`-1	5'-GCTGTCCTGCGTAGATTT-3'		RACE
		l4_5`-2	5'-GAGAGAGAGACGAGGCGGAAA-3'	qPCR	RACE

Для определения нуклеотидных последовательностей генов актина и тубулина были использованы вырожденные праймеры, известные по литературным данным [226,227], сконструированные для *Trametes versicolor*. После проведения амплификации и последующего секвенирования по Сенгеру, к полученным нуклеотидным последовательностям генов актина и тубулина были сконструированы праймеры для проведения количественной ПЦР (табл. 4).

2.6.8. Проведение полуколичественной ПЦР

Верификацию результатов сборки транскриптов проводили при помощи полуколичественной ПЦР с использованием праймеров, произвольно подобранных на фрагменты собранных последовательностей. Реакцию проводили в следующих условиях: 95°C – 4 мин; 95°C – 30 сек; 55°C – 1 мин; 72°C - 1 мин, общее число циклов – 18, 25 и 35. Реакционная смесь (10 мкл для каждого образца) включала в себя:

- 1 мкл taq-буфера (x10);
- 0,2 мкл 10 mM dNTP (Евроген, Россия);
- 0,1 мкл Taq-Polymerase (Евроген, Россия);
- 1 мкл смеси прямого и обратного специфических праймеров (Табл. 4), концентрация каждого в исходной смеси равна 10 мкмоль;
- 100 нг соответствующей матрицы кДНК.

В качестве референсных генов использовали гены, кодирующие α -Актин и β -Тубулин.

2.6.9. Получение полноразмерных последовательностей генов лакказ *T.hirsuta*

Поиск контиг, потенциально принадлежащих последовательностям генов лакказ, проведен с использованием алгоритмов локального выравнивания BLAST на общем пуле контиг с запросом на поиск шести консервативных аминокислотных блоков (мотивов) лакказ, выявленных при выравнивании аминокислотных последовательностей лакказ базидиомицетов (*Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Pleurotus ostreatus*; *Dichomitus squalens*; *Laccaria bicolor*; *Coprinopsis cinerea*; *Stereum hirsutum*): **HWHG**; **VP(T)DQA(T)GTF(Y)WYHSHL(A)STQYC**; **KRYRFRLV(D)S(N)**; **PPTVPVLL**; **RHPFHLHGHV** и **HCHIDF(W)HL** с учетом вариабельности некоторых аминокислотных остатков внутри блоков. Получение полноразмерных последовательностей транскриптов лакказ осуществляли методом быстрой амплификации 5' и 3' концов кДНК (RACE-PCR), с помощью набора для быстрой амплификации концевых фрагментов кДНК "Mint RACE cDNAamplificationset" (Евроген). На каждый транскрипт были подобраны по 2 пары уникальных геноспецифических праймеров (табл. 4). Получение полных

последовательностей генов лакказ проводили согласно инструкции производителя. После амплификации полученные продукты RACE-ПЦР были отсеквенированы по методу Сангера (Евроген, Россия) и объединены по схеме, представленной на рис. 10.

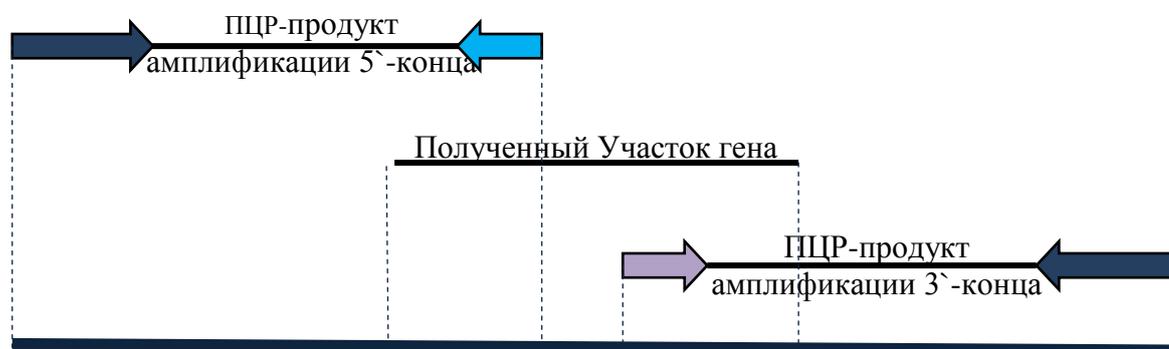


Рис. 10. Схема сборки полных последовательностей транскриптов генов, кодирующих изоферменты лакказ методом RACE-ПЦР.

2.6.10. Проведение ПЦР в реальном времени

Количественную ПЦР проводили с использованием термоциклера StepOnePlus (Applied Biosystems, США). Реакцию амплификации проводили с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+ROX (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. В реакционную смесь объемом 20 мкл вносили 100 нг кДНК, и геноспецифические праймеры (табл. 4) в концентрациях 0,2-0,4 мкМ (концентрацию оптимизировали для каждой пары). Режим амплификации: 10 мин при 95°C, 40 циклов (95°C - 15 сек, 58°C - 20 сек, 72°C - 30 сек), и плавление продукта реакции (Melting Curve program: 70–95°C, +1°C/c). Специфичность праймеров и однородность продукта определяли по кривым плавления. Пороговую линию (Thresholdline) для определения Ct выставляли для каждого ампликона индивидуально, но одинаково для всех образцов. Реакции проводили в трех технических повторах на 96-луночных планшетах. Отрицательным контролем к каждой паре праймеров служила ПЦР-смесь, не содержащая матрицу. Эффективность реакции определяли серией 10-кратных разведений кДНК по тангенсу угла наклона линии тренда. Данные амплификации обрабатывали по методу ΔCt . Значения Ct интересующего гена (мишень) нормализовали на референсный ген (тубулин). Из значений Ct были рассчитаны относительные величины (RQ) по формуле:

$$RQ=2^{-\Delta Ct},$$

где ΔCt представляло собой разность между средним значением Ct мишени и средним значением Ct референсного гена (для каждой матрицы):

$$\Delta Ct=Ct_{срмишени} - Ct_{срреференсного\ гена\ соотв.матрицы}$$

2.6.11. Биоинформатический анализ последовательностей лакказ

Множественные выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили при помощи ПО MUSCLE (v3.7) [228] и ClustalW [229]. Филогенетический анализ проводили следующим образом: после множественного выравнивания последовательностей неоднозначные регионы удаляли при помощи ПО Gblocks (v0.91b). Филогенетическое дерево было построено с помощью метода максимального правдоподобия, в программе PhyML (v3.0 aLRT) [230]. Степень доверия внутренним ветвям оценивали с помощью метода бутстрэп (на основании 100 сгенерированных выборок). Графическое представление филогенетического дерева реализовано в программе TreeDyn (v198.3) [231]. Для анализа использовали последовательности лакказ из грибов рода *Trametes*, депонированных в базе данных NCBI со степенью идентичности более 70% к лакказам LacA-LacE *T. hirsuta*.

Расчет гипотетических молекулярных весов и изоэлектрических точек для каждой последовательности лакказы, а так же оценку идентичности нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью SequenceManipulationSuite [232], инструментов ресурса ExPASy [233] и алгоритмов BLAST [234]. Сайты гликозилирования белковых последовательностей были предсказаны с помощью NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dGP/services/NetNGlyc/>) [235]. Консенсусные последовательности консервативных доменов визуализировали с использованием приложения Web-logo (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение профилей внеклеточных белков *T. hirsuta* продуцируемых базидиомицетом на средах различного состава

Как было показано ранее [236–238], базидиомицет *T. hirsuta* 072 обладает эффективным лигнин-модифицирующим комплексом, основным лигнолитическим ферментом которого предположительно является лакказа. Несмотря на наличие в КЖ этого гриба широкого спектра изоформ/изоферментов лакказ, к настоящему времени удалось выделить и охарактеризовать лишь мажорную форму фермента – продукт гена *lacA*. Данные о других ферментах лигнин-модифицирующего комплекса *T. hirsuta* отсутствуют. В связи с этим первым этапом работы была характеристика качественного состава секретомов базидиомицета, полученных при культивировании гриба в различных условиях, в том числе в условиях индукции лакказ, что позволило бы пролить свет на роль индивидуальных ферментов в процессах лигнинолиза.

В данном исследовании для культивирования *T. hirsuta* было выбрано два индуктора биогенеза лакказ: ионы меди Cu^{2+} , являющиеся одним из наиболее активных индукторов по литературным данным, и лигноцеллюлозный субстрат - овсяная солома, содержащая значительное количество лигнина (до 20% сухого вещества), который может индуцировать экспрессию белков лигнин-модифицирующего комплекса.

3.1.1. Сравнительный анализ профилей активностей внеклеточных белков *T. hirsuta* при культивировании на ГП и ЛЦ средах (в том числе, изменяющихся в ответ на индукцию лакказ медью)

Известно, что лигнолитические ферменты являются продуктами вторичного метаболизма и секретируются в зависимости от состава среды в конце логарифмической или в стационарной фазе роста. Однако максимальная продукция ферментов наблюдается в различные временные диапазоны, что зависит как от физиолого-биохимических свойств исследуемого штамма и состава среды культивирования, так и от наличия индукторов биосинтеза [72]. В данном случае время культивирования было выбрано основываясь на ранее полученных результатах по продукции лакказы на средах различного состава [210,239]. Состав ЛМС *T. hirsuta* оценивали по активностям целевых ферментов этого комплекса [240,241]: лакказы, пероксидаз (MnP, LiP, VP) и арилалкогольоксидазы (ААО).

Фаза роста гриба непосредственно влияет на профиль как секретируемых, так и внутриклеточных белков. Кроме того, в зависимости от состава питательной среды продолжительность той или иной фазы роста может варьировать.

На рисунке 11А приведена кривая накопления биомассы при культивировании *T. hirsuta* на синтетической среде и среде, содержащей лигноцеллюлозный субстрат. Характер кривых накопления биомассы при культивировании гриба *T. hirsuta* на средах одинакового состава в присутствии индуктора (ГП/Cu²⁺) и без него был практически идентичен в фазе экспоненциального роста. Как видно, она завершается уже к 8 - 10 суткам культивирования на ГП среде, после чего наблюдается стационарная фаза роста (ГП) или лизис культуры (ГП/Cu²⁺). Характер кривых накопления биомассы при дальнейшем культивировании на исследуемых средах значительно отличался. Так, при культивировании на среде без индуктора динамика накопления биомассы была характерна для стационарной фазы роста, а на среде с индуктором наблюдалось резкое падение количества биомассы с последующим выходом на плато. Интересно отметить, что накопление биомассы после 15 суток культивирования было достоверно ниже на среде ГП/Cu²⁺ по сравнению с ГП.

Поверхностное культивирование увеличивало фазу экспоненциального роста (до 18-21 дней), а так же давало больший выход воздушно-сухой биомассы (в 1,6 раза). В присутствии CuSO₄, накопление биомассы мицелия на обеих средах было в 1,5-1,6 раза выше, чем без индуктора, однако характер кривой роста сохранялся в обоих случаях.

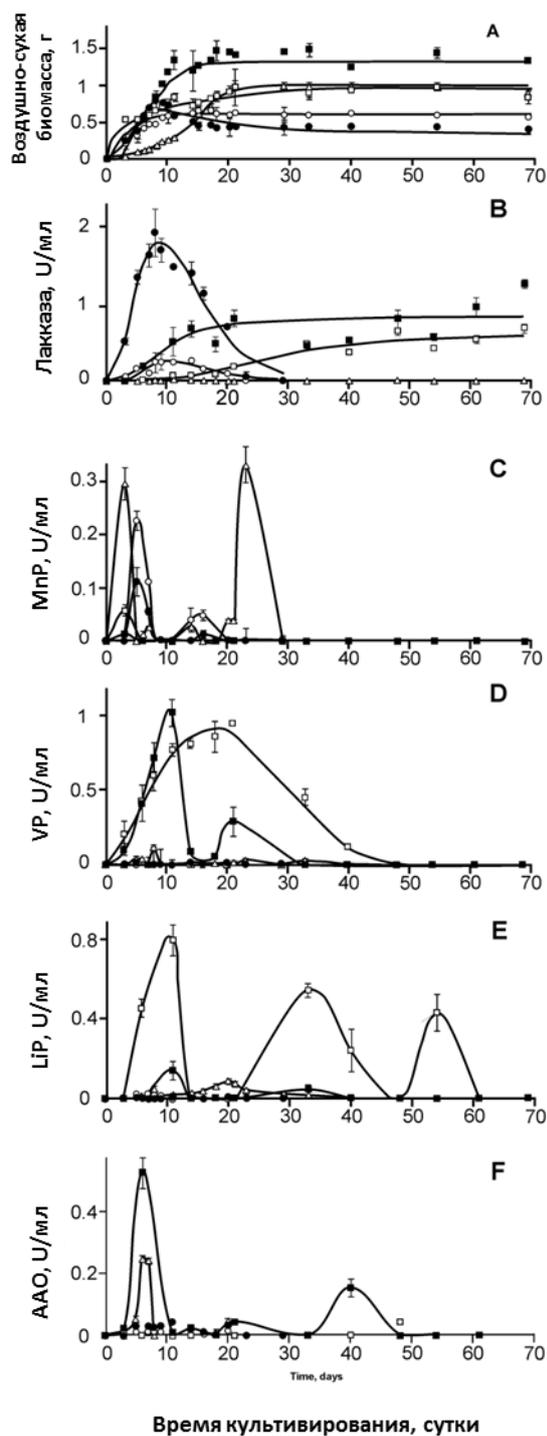


Рис. 11. Динамика роста и активности лигнолитических ферментов базидиомицета *T. hirsuta* 072 при культивировании на средах различного состава. А – накопление воздушно-сухой биомассы мицелия; В – активность лакказы; С – активность MnP; D – активность VP, E – активность LiP, F – активность AAO. Условные обозначения сред культивирования:

○ - ГП ● - ГП/Cu²⁺ □ - ЛЦ ■ - ЛЦ/Cu²⁺

На рис. 11 (B-F) представлена динамика активностей основных лигнолитических ферментов базидиальных грибов – представителей белой гнили древесины. Динамика активности лакказы при культивировании гриба *T. hirsuta* на средах ГП/Cu²⁺ и ГП имела схожий характер. И в том, и в другом случае наблюдалось постепенное увеличение активности фермента в логарифмической фазе роста, достигающее максимального значения к 8-ым суткам культивирования: 2,58 МЕ при культивировании на среде ГП/Cu²⁺ и 0,34 – на среде ГП (Рис. 11). Резкое падение ферментативной активности (практически в 2 раза) на среде ГП/Cu²⁺ к 10 сут культивирования коррелировало с резким падением биомассы продуцента. Таким образом, максимальная продукция лакказ при росте гриба *T. hirsuta* на средах ГП и ГП/Cu²⁺ наблюдалась на 8-ые сутки культивирования, однако внесение индуктора CuSO₄ увеличивало уровень продукции фермента почти в 8 раз. При культивировании на среде с лигноцеллюлозным субстратом наблюдалась индукция активности лакказы, которая увеличилась по мере роста гриба и достигла плато в стационарной фазе роста, как в присутствии, так и в отсутствие CuSO₄. Следует отметить, что существенной индукции лакказ при внесении CuSO₄ при культивировании на среде с лигноцеллюлозным субстратом не наблюдалось.

Для профилей активности MnP на среде ГП характерно два основных пика: первый в течение экспоненциальной фазы роста, а второй - в стационарной. При этом продукцию активного фермента подавлялась как при культивирование в условиях аэрации, так и при внесении CuSO₄. Как показано на рис. 11С, первый пик активности MnP приходится на 3-й день культивирования на ЛЦ среде и смещается к 5-м суткам в случае ГП среды. Однако второй пик активности MnP полностью исчезал на ЛЦ средах. В отличие от MnP, активности марганец-независимой пероксидазы (Панель D) и лигнин пероксидазы (Панель E) были низкими в условиях культивирования на ГП среде. Активности как LiP, так и VP были намного выше при культивировании на ЛЦ среде, предполагая индукцию этих ферментов компонентами лигноцеллюлозного субстрата. Так же наблюдалось ингибирование продукции этих ферментов внесением CuSO₄ (отмечено сильное влияние на LiP и, по крайней мере, частичный эффект для VP).

Секреция перекись-генерирующего фермента арилалкогольоксидазы носила более сложный характер. Основной пик активности приходился на 6-й день культивирования на ЛЦ среде, в экспоненциальной фазе роста базидиомицета. Аэрация в значительной степени подавляла ферментативную активность ААО, в то же время, внесение CuSO₄ значительно увеличило активность фермента (ГП среда). Лигноцеллюлозный субстрат практически не изменял уровень активности фермента вплоть до стационарной фазы, а дополнительное

внесение CuSO_4 в ЛЦ среду нивелировало данную разницу и индуцировало продукцию фермента без изменения времени появления его основного пика (Панель F).

Высокие уровни активности были показаны для MnP, LiP, VP, а также для перекись-генерирующего фермента ААО (рис. 11), определяемые общепринятыми методами для мониторинга продукции пероксидаз и вспомогательных белков в образцах культуральной жидкости [212,213,215]. Однако для измерения активностей LiP, VP и ААО в качестве субстрата применяется вератровый спирт в различных концентрациях (8 mM, 2 mM, and 5 mM, соответственно), и, т.о., измерение специфических индивидуальных активностей данных ферментов в культуральной жидкости затруднено. Тем не менее, измерение профилей активности ферментов в различных условиях роста предполагало индивидуальные паттерны секреции для каждого фермента (или отдельных изоформ с разными ферментативными свойствами) в процессе роста гриба. Например, активность ААО увеличивалась с внесением ионов Cu^{2+} , и не индуцировалась на ЛЦ среде, в отличие от LiP и VP, которые ингибировались внесением ионов меди (рис. 11).

В ходе культивирования *T. hirsuta* на ЛЦ среде у LiP, MnP и VP было отмечено несколько пиков активностей ферментов, предполагая периодический характер их индукции продуктами деградации лигноцеллюлозы, сопровождающейся затем новым циклом деградации субстрата. Вполне возможно, что некоторая часть активности LiP измерить не удалось, поскольку, несмотря на широкую представленность генов кодирующих LiP у грибов рода *Trametes* [242], стабильность этого фермента в КЖ достаточно низкая [243]. Таким образом, анализ состава секретомов базидиомицета, является более надежным инструментом для оценки продукции внеклеточных ферментов.

3.1.2. Оптимизация пробоподготовки внеклеточных белков *T. hirsuta* для исследования секретомы

Основные трудности при характеристике препаратов внеклеточных белков высших грибов связаны с подготовкой проб для анализа секретомов. Качество экстракции и разделения белков является важной частью успешной идентификации компонентов секретомы. В работах [218,219,244,245] были предприняты попытки создать универсальный протокол выделения внеклеточных белков базидиальных грибов, однако они не увенчались успехом, т.к. по-видимому, данная процедура в значительной степени зависит от продуцируемых конкретным штаммом внеклеточных метаболитов, и поэтому индивидуальна для каждого гриба. Среди наиболее распространенных факторов, препятствующих анализу секретомов - низкая концентрация белка и сложный состав низкомолекулярных метаболитов, секретируемых в КЖ. Анализ особенно затруднен, если культивирование организма

проводят на природных субстратах, когда усиливается пигментация КЖ, или при высоких концентрациях солей, используемых для индукции биосинтеза и/или повышения стабильности фермента.

Для анализа образцов секретомов *T. hirsuta* сравнили несколько процедур пробоподготовки, показавшие лучшие результаты на других грибах:

- Экстракция смесью хлороформ / метанол [216],
- Экстракция смесью хлороформ / метанол с дополнительным этапом диализа [217],
- Экстракция ацетоном [218],
- Экстракция смесью ТХУ/Ацетон [219], и
- Экстракция с помощью коммерческого набора 2D Protein Kit (Bio-Rad, США) [218].

Качество экстракции оценивали после визуализации белковых электрофореграмм, полученных с помощью 2D-электрофореза по количеству и разрешению индивидуальных компонентов (Таблица 5).

Таблица 5. Сравнение методов экстракции внеклеточных белков из КЖ базидиомицета *T. hirsuta* 072

	Метод экстракции	Количество компонентов на гелях, % от максимально разрешенных	Результат
1	<i>Экстракция смесью Хлороформ / метанол</i>	15-20%	Низкий выход белка
2	<i>Модифицированная экстракция смесью Хлороформ / метанол</i>	15-20%	Низкий выход белка; Пигментация препарата сохранялась
3	<i>Экстракция ацетоном</i>	до 30% Мало индивидуальных белков	Средний выход белка; Сложности при перерастворении перпарата; Низкое разрешение
4	<i>Экстракция смесью ТХУ/Ацетон</i>	100%	Высокий выход белка; Хорошее разрешение белков для ГП сред
5	<i>2D Protein Kit</i>	до 25%	Низкий выход белка; Хорошее разрешение белков
6	<i>Экстракция смесью ТХУ/Ацетон</i>	100%	Высокий выход белка Хорошее разрешение белков для ЛЦ сред

Оба метода выделения с использованием смеси хлороформ/метанол не обеспечивали достаточное экстрагирование белков для получения препарата необходимого качества, даже после дополнительной стадии концентрирования образца с помощью диализа. Кроме того, экстракция ацетоном позволяла добиться перерастворения после осаждения лишь ~30% белков, предположительно, из-за частичного окисления сульфгидрильных групп, кроме того, полученные гели содержали белковые пятна низкого разрешения. В связи с чем, дополнительные стадии очистки белковых препаратов применить было невозможно.

Выделение набором 2D Protein Kit позволяло получать 2D гели с хорошим разрешением белковых компонентов, однако, количество индивидуальных белков на электрофореграммах было невелико, поскольку данный метод не эффективен для образцов с низкой концентрацией белков. Таким образом, этот метод не подходит для изучения секретомов грибов из-за низкой концентрации секретируемых белков при исследуемых условиях даже после концентрации КЖ в 10-20 раз. Так же использование набора не рассчитано на большие объемы образцов, что затрудняет его применение для исследования секретомов грибов. В то же время, экстракция смесью ТХУ/ацетон, как следует из литературных данных, является эффективным методом для выделения образцов с низкой концентрацией белка, а также позволяет удалять углеводы, содержащиеся в КЖ грибов [219,246,247]. Данный метод осаждения показал свою эффективность при выделении белков из образцов КЖ, полученных при росте гриба на ГП среде, позволив получить максимально разрешенные и содержательные двумерные электрофореграммы. Однако для сред с внесением лигноцеллюлозного субстрата результаты были хуже из-за высокой степени пигментированности КЖ. Эту проблему удалось решить за счет сочетания осаждения белков смесью ТХУ/ацетон и дополнительным переосаждением набором 2D Protein Kit с последующим растворением в лизис-буфере. Последовательное переосаждение белков позволило получить хорошо разрешенные электрофореграммы, даже для сильно пигментированных ЛЦ сред с высоким содержанием грибных метаболитов. В результате, на 2D электрофореграммах было получено 50-100 индивидуальных компонента, что согласуется с данными других исследователей в случаях других грибов белой гнили древесины, где было получено от 20 до 200 белков (в зависимости от сред культивирования и методов экстракции) [217,248].

Эти 2 метода были использованы нами в дальнейшей работе: экстракция смесью ТХУ/ацетон – для синтетических сред, и экстракция смесью ТХУ/ацетон с дополнительной очисткой препаратов набором 2D Protein Kit – для сред, содержащих лигноцеллюлозный субстрат.

3.1.3. Сравнительный анализ профилей внеклеточных белков, продуцируемых *T. hirsuta* при культивировании на средах различного состава

Во всех исследованных ранее случаях [6,212,249], природные субстраты всегда индуцировали продукцию спектра белков, отличающегося от спектра, продуцируемого на синтетических средах, как по качественному составу, так и по количественному. В то же время, при анализе транскрипционных изменений в ходе индукции белков различными видами древесины (сосны, ели, пихта бальзамической и клена) [250] у гриба *Phanerochaete carnosae*, были показаны только количественные различия для всех видов субстрата, предполагая тем самым идентичный набор ферментов, продукция которого независима от вида древесины.

Для данного исследования, при глубинном культивировании на ГП средах (без индукции CuSO_4 , и с индукцией) образцы для 2D-электрофореза были собраны на 5-е и 8-е сутки культивирования, на пике ферментативных активностей гриба в культурной жидкости. При поверхностном культивировании в присутствии лигноцеллюлозного субстрата анализировали пробы, собранные на 3-й, 11-й и 21-й дни роста гриба. Исследование внеклеточных белков с помощью двумерного электрофореза показало существенные различий в продукции белковых компонентов в зависимости от состава среды и времени культивирования (рис. 12).

По сравнению с культивированием на ГП среде, при культивировании в присутствии природного субстрата количество продуцируемых белков резко увеличивалось. Идентификация отдельных белковых компонентов с помощью масс-спектрометрии позволила выявить ряд основных лигнолитических, целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов в секрете *T. hirsuta*. Результаты идентификации приведены в таблице 6.

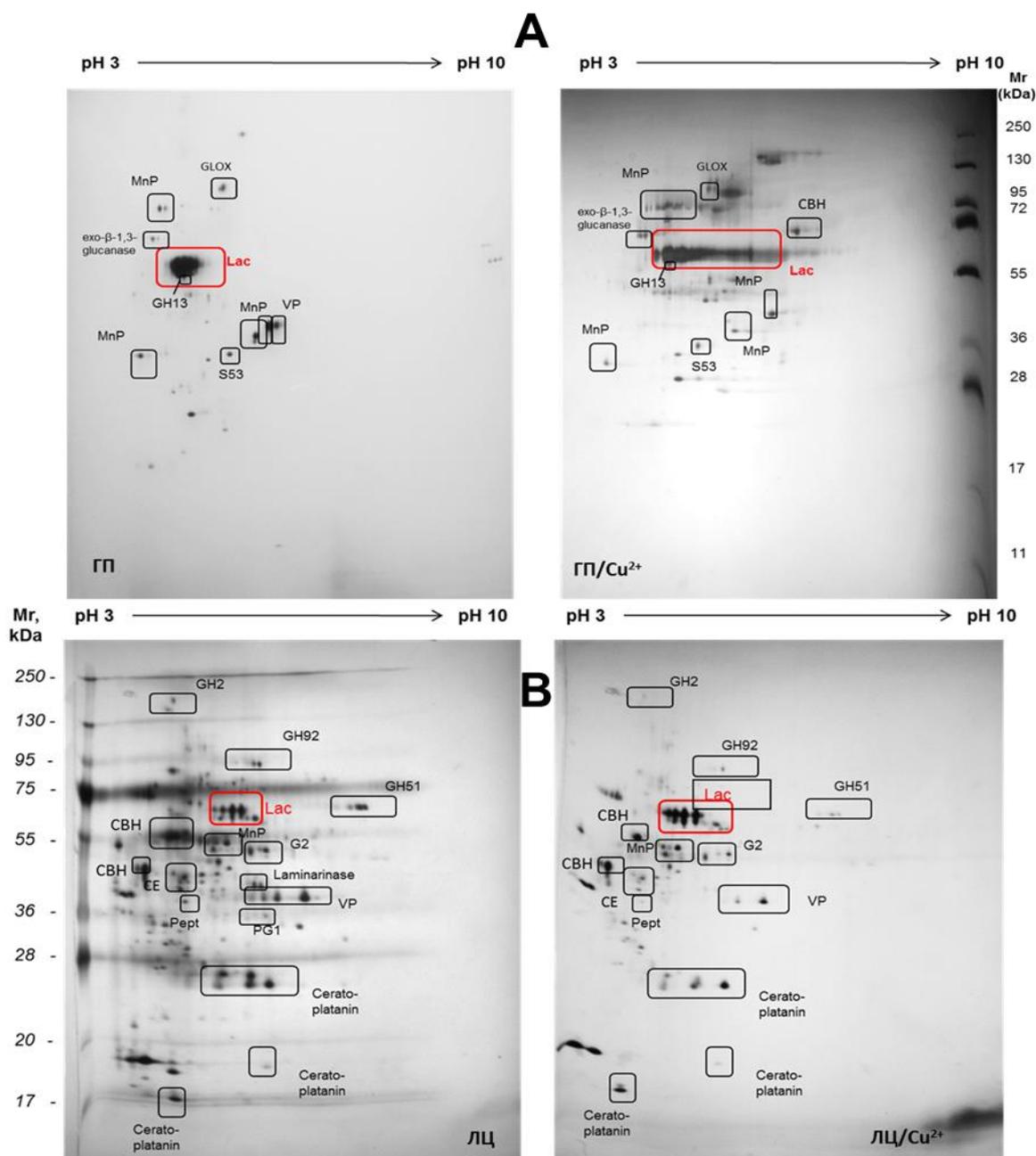


Рис. 12. Анализ секретомов *T. hirsuta* 072. Внеклеточные белки, полученные из образцов культуральной жидкости и разделенные методом двумерного электрофореза. А - ГП среда, без индукции (слева) и с индукцией CuSO_4 (справа), 8-е сутки культивирования. В - ЛЦ среда, без индукции (слева) и с индукцией CuSO_4 (справа), 3-и сутки культивирования. Белки, идентифицированные с помощью MALDI-TOF/TOF MS анализа и отмеченные на электрофореграммах: Lac – лакказа; MnP – марганец-зависимая пероксидаза; VP – марганец-независимая пероксидаза; GLOX – глиоксальоксидаза; GH2 – гликозид-гидролаза, семейство 2; GH13 – гликозид-гидролаза, семейство 13; GH51 – гликозид-гидролаза, семейство 51; GH92 – гликозид-гидролаза, семейство 92; CBH – целлюбиогидролаза I; G2 – глюкоамилаза G2; CE – эстераза, семейство 16; S53 – протеаза семейства S53; Pept – аспарат пептидаза; CP – церато-платанины.

Таблица 6. Внеклеточные белки, идентифицированные с помощью MALDI TOF/TOF масс-спектрометрии при культивировании *T. hirsuta*

Идентифицированные белки	Наиболее вероятный гомолог (Идентификационный номер в базе данных NCBI, Organism)	Количество изоформ (изоферментов); -Cu/+Cu						Физиологическая роль
		ГП среда			ЛЦ среда			
		5 сутки	8 сутки	20 сутки	3 сутки	11 сутки	21 сутки	
<i>Лигнолитические ферменты</i>								
Лакказа ^{ab}	KP027478 <i>T. hirsuta</i> ; laccase A ¹	8/13	7/11	7/10	8/8	4/5	5/8	Деградация лигнина
Марганец-зависимая пероксидаза ^{ab}	JQ388597 <i>L. gibbosa</i> ; manganese peroxidase 2	10/14	6/4	5/4	4/3	н/д	н/д	
Марганец-независимая пероксидаза ^b	EIW62513 <i>T. versicolor</i> ; manganese-repressed ² peroxidase	2/2	1/0	н/д	4/2	6/4	0/2	
<i>Гликолитические ферменты</i>								
Целлобиогидролаза I ^b	EIW64126 <i>T. versicolor</i> ; cellobiohydrolase I ³	н/д	0/4	3/4	4/3	4/2	1/2	Целлюлолитические ферменты
Экзо-β-1,3-глюканаза ^b	EIW63632 <i>T. versicolor</i> ; exo-beta-1,3-glucanase ⁴	2/0	2/3	0/3	н/д	н/д	н/д	Целлюлолитические ферменты
Эндо-β-1,3-глюканаза (ламинариназа) ^b	EIW53084 <i>T. versicolor</i> ; laminarinase ⁵	н/д	н/д	н/д	2/0	2/0	1/0	Модификация клеточной стенки
Гликозид-гидролаза, семейство 2 ^b	EIW63844 <i>T. versicolor</i> ; glycoside hydrolase	н/д	н/д	н/д	2/1	1/1	н/д	Разрыв гликозидных связей
Гликозид-гидролаза, семейство 13 (α-амилаза) ^b	EIW55835 <i>T. versicolor</i> ; glycoside hydrolase	н/д	1/1	1/1	н/д	н/д	н/д	-
Гликозид-гидролаза, семейство 51 ^b	EIW55650 <i>T. versicolor</i> ; glycoside hydrolase family 51 protein	н/д	н/д	н/д	9/7	8/6	4/5	Основной гемицеллюлолитический фермент
Гликозид-гидролаза, семейство 92 ^b	EIW52130 <i>T. versicolor</i> ; glycoside hydrolase family 92 protein	н/д	н/д	н/д	3/1	7/8	5/7	Модификация клеточной стенки
Эндополигалактуроназа PG1 ^b	CDO68615 <i>T. cinnabarina</i> ; glycoside hydrolase family 28 protein	0/1	н/д	н/д	3/0	3/3	2/2	Пектин-разрушающие ферменты
Эстераза, семейство 16 ^b	CDO76317 <i>T. cinnabarina</i> ; carbohydrate esterase family 16 protein	н/д	н/д	н/д	5/5	0/2	2/2	Пектин-разрушающие ферменты

Глюкоамилаза (G2) ^b	EIW63814 <i>T. versicolor</i> ; Glucoamylase ⁶	н/д	н/д	н/д	4/3	2/2	н/д	
<i>Вспомогательные ферменты</i>								
Медь-содержащая оксидаза (глиоксальоксидаза) ^b	CDO70163 <i>T. cinnabarina</i> ; Copper radical oxidase	2/1	2/2	2/2	н/д	н/д	н/д	Генерация перекиси водорода
<i>Другие белки</i>								
Протеаза семейства S53 ^b	EIW62828 <i>T. versicolor</i> ; family S53 protease	1/3	1/1	н/д	н/д	0/1	н/д	
Аспартатпептидаза ^b	ETW87129 <i>H. irregulare</i> ; aspartic peptidase	н/д	н/д	н/д	1/0	0/1	н/д	
Церато-платанины ^b	EIW62257 <i>T. versicolor</i> ; cerato-platanin	н/д	н/д	н/д	7/8	5/2	2/3	Фитотоксичные белки

^aБелок идентифицирован с помощью пептидного фингерпринта; ^bБелок идентифицирован с помощью MS/MS анализа пептидов; ¹ На 21 сутки культивирования на ЛЦ среде отмечена продукция второй изоформы лакказы; ² Анализ последовательности гена EIW62513.1 показал, что она является гомологом марганец-независимых пероксидаз, но аннотирована в базе данных как марганец-репрессуемая пероксидаза. Похожие последовательности были аннотированный, как пероксидазы II класса и марганец-зависимые пероксидазы; ³Гомологичная последовательность аннотирована как гликозид-гидролаза семейства 7 [*Trametes cinnabarina*]; ⁴Гомологичная последовательность аннотирована как гликозид-гидролаза семейства 55 [*Hebeloma cylindrosporum* h7]; ⁵Гомологичная последовательность аннотирована как гликозид-гидролаза семейства 16 [*Ceriporiopsis subvermispора* B]; ⁶Гомологичная последовательность аннотирована как гликозид-гидролаза семейства 15 [*Phanerochaete carnosа* ННВ-10118-sp]; н/д– белок не был найден на электрофореграмме.

Продукция лигнинолитических ферментов

Состав ЛМС может существенно различаться для отдельных базидиомицетов. Например, известно, что гриб белой гнили *Phanerochaete chrysosporium* не производит классические лакказы [30]; и напротив, *Pleurotus ostreatus* не продуцирует лигнинпероксидазы [251]. Последние генетические исследования позволили открыть новые семейства пероксидаз [21], такие как семейство гем-тиолатпероксидаз, включающее например классические хлорпероксидазы *Caldariomyces fumago* (CfuCPO) и ароматические пероксигеназы агариикоидных базидиомицетов (APO), а так же семейство грибных и бактериальных пероксидаз-деколоризаторов [252–254]. Тем не менее, для большинства этих генов не были найдены белковые продукты, а, следовательно, точных данных об их субстратной специфичности и свойствах до сих пор нет.

Лакказы считаются одними из основных ферментов лигнин модифицирующего комплекса грибов рода *Trametes* [179,180]. При культивировании на ГП среде фракция лакказ была действительно преобладающей (Рис. 12А) в течение всего периода культивирования. На ГП среде было идентифицировано несколько белковых компонентов, соответствующих лакказам. На электрофореграммах они образовывали достаточно компактную группу, с незначительными отличиями по значениям молекулярной массы и ИЭТ ($M_r=60-70$ кДа, ИЭТ около 4). В то же время на среде ГП/ Cu^{2+} количество белковых компонентов, идентифицированных как лакказы, возрастало, а значения их ИЭТ варьировались в значительно большем диапазоне ($\Delta pI > 2$). Однако основная часть белков так же лежала в узком диапазоне значений ИЭТ ($pI=3.5 - 4.0$). Увеличение числа секретируемых изоформ в присутствии индуктора было ранее показано для ряда базидиомицетов: *Trametes gallica* [255], *Trametes versicolor* [256], *Pleurotus ostreatus* [71,257]. Тем не менее, в ходе культивирования, количество изоформ/изоферментов лакказ уменьшалось, особенно на среде с внесением индуктора (с 13 в начале экспоненциальной фазы роста, до 10 - при переходе в стационарную фазу) (таблица 6). В отличие от ГП среды, при культивировании в присутствии лигноцеллюлозного субстрата такой тенденции не наблюдалось, что соответствует существующим данным [70]. Внесение $CuSO_4$ не изменяло уровень экспрессии РНК лакказ или продукции белка у *Trametes versicolor*, выращенного в присутствии 2,5-ксилидина, но значительно увеличивало активность фермента, очевидно, в результате более эффективного включения кофактора. Количество продуцируемых в начале культивирования изоформ лакказ на ЛЦ среде было практически таким же, как и на ГП среде (8), однако оно не увеличивалось с внесением ионов Cu^{2+} (Таблица 6).

Сравнение карт *de novo* секвенированных пептидов идентифицированных лакказ *T. hirsuta* между собой, показало, что в основном продуцируемым на всех средах культивирования изоферментом является LacA (GenBank: KP027478). Однако после 21 суток культивирования на ЛЦ среде была обнаружена продукция второго, отличного от LacA изофермента. Подобные изменения предполагают, что экспрессия немажорных форм лакказ зависит от накопления специфических индукторов, по-видимому, представляющих собой продукты деградации лигнина. Ранее аналогичный эффект был показан на уровне транскрипции для лакказ гриба *Phlebia radiata* [200].

Мажорная форма фермента - LacA *T. hirsuta* на всех средах продуцировалась в виде нескольких изоформ, с изменяющейся степенью гликозилирования молекул белка, однако при внесении ионов меди количество изоформ возрастало (Рис. 12; Табл. 6), что так же характерно для некоторых базидиальных лакказ [258].

Другим активно продуцируемым ферментом лигнолитического комплекса *T. hirsuta* является марганец-зависимая пероксидаза, продукция множественных изоформ которой была обнаружена при культивировании на ГП среде. В основную группу входило около 10 изоформ в кислой области ИЭТ (pI~3; Mr=50-60 кДа), секретируемых на 5-е сутки культивирования и прекращавших секрецию к 8-м суткам (Рис. 12). По-видимому, продукция MnP подавлялась внесением лигноцеллюлозного субстрата, т.к. секретомный анализ и изучение динамики активности MnP выявили значительно меньшую активность и представленность фермента на ЛЦ средах (Рис. 11С и 12В). Напротив, добавление в среду культивирования CuSO₄, который подавлял продукцию MnP на ГП среде, в случае ЛЦ среды оказывал меньшее влияние, что не согласуется с данными об увеличении в присутствии ионов меди активности марганец-зависимой пероксидазы у *Trametes trogii* [259] и транскрипции этих генов у *Ceriporiopsis subvermispora* [260] при культивировании грибов на синтетической среде без природного субстрата.

Среди прочих гем-пероксидаз, удалось идентифицировать только гомолог марганец-независимых пероксидаз, нуклеотидные последовательности которых для других грибов в базе данных NCBI аннотированы так же как гомологи MnP [261], а так же как белки, чья транскрипция подавляется ионами марганца [262]. Данный белок продуцировался как на ГП среде, так и на ЛЦ среде, однако характеризовался значительно более высокой молекулярной массой изоформ на ГП среде (> 50 кДа), чем на LC среде (~ 40 кДа), несмотря на наличие пептидов с одинаковыми массами в триптических картах (масс-спектрах). Как показано на рис. 12 и в таблице 6, белковый продукт LiP не был найден ни при каких условиях роста, предполагая, что реально удалось измерить активность VP, а не LiP. Так же была идентифицирована глиоксальоксидаза – фермент

обеспечивающий продукцию перекиси водорода, необходимой для работы пероксидаз. Присутствие фермента отмечено на ГП среде, как в присутствии, так и в отсутствии меди. В отличие от глиоксальоксидазы ААО идентифицировать в секретоме не удалось, несмотря на то, что ее активность была отмечена в КЖ. Это может быть объяснено низкой специфичностью измерения активности ААО с использованием вератрового спирта в качестве субстрата, т.к. концентрация эндогенной H_2O_2 в среде может быть достаточно высокой и давать ложноположительные результаты при измерениях. Таким образом, ЛМС *T. hirsuta* 072 в основном состоит из множественных изоформ/изоферментов лакказ, марганец-независимых пероксидаз, а так же марганец-зависимых пероксидаз на начальных этапах культивирования.

Продукция целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов

В секретоме *T. hirsuta* было идентифицировано значительное количество разнообразных целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов. Ранее было показано, что для грибов белой гнили древесины характерна продукция целлюлаз семейств GH5, GH6, GH7 и GH9, содержащих углеводов связывающие участки, и семейства CBM1 [11,251,263]. Так же большинство базидиомицетов способно продуцировать целлобиозодегидрогеназы и медь-зависимые полисахарид монооксигеназы (GH61), а экспрессия (продукция) ксилоглюканаз (GH74), эндо-ксиланаз (GH10), β -глюкуронидаз (GH79), ацетилксилаэстераз (CE1) и метилэстераз (CE15) значительно увеличена в грибах-возбудителях белой гнили по сравнению с возбудителями бурой гнили древесины.

Как показано на рисунке 12 и в табл. 6, в секретоме *T. hirsuta*, мы обнаружили целлобиогидролазу I и эндополигалактуроназу на всех средах культивирования, экзо- β -1,3-глюканазу и гликозид-гидролазу семейства GH13 (только на ГП среде), а так же значительное количество гликозид-гидролаз, индуцируемых внесением лигноцеллюлозного субстрата: эндо- β -1,3-глюканаза, эстераза семейства 16, глюкоамилаза (G2), и гликозид-гидролазы семейств 2, 51 и 92. Таким образом, в отличие от уже описанных видов возбудителей белой гнили древесины, которые преимущественно экспрессируют ферменты с целлобиазной и ксилоназной активностью, ферменты, секретируемые *T. hirsuta*, по-видимому, проявляют в основном глюканазную и маннозидазную активности. Активная секреция этих групп ферментов наблюдалась в начале культивирования на 3-и и 11-е сутки, и значительно снижалась к 21-м. При этом на ГП среде эти белки идентифицировать не удалось, предполагая тем самым отсутствие их конститутивной выработки.

Присутствие в секретоме целлюбиогидролаз, экзо- β -1,3-глюканазы, эндо- β -1,3-глюканазы и гликозид-гидролаз различных семейств на ранних стадиях культивирования гриба подтверждает, что *T. hirsuta* обладает высоким целлюлолитическим потенциалом [264,265]. Важно отметить, что *T. hirsuta* уже на начальных этапах роста демонстрирует продукцию целлюбиогидролазы I, которая способствует деградации целлюлозы, за счет образования новых концевые группы полисахаридов путем отщепления целлюбиозы от редуцирующих концов волокон целлюлозы [266].

В ходе работы было показано, что изменения среды культивирования значительно влияет на спектр продуцируемых белков. В отсутствии лигноцеллюлозного субстрата в секретоме *T. hirsuta* удалось идентифицировать лишь несколько белков целлюлолитического комплекса: целлюбиогидролазу I, экзо- β -1,3-глюканазу, α -амилазу и эндополигалактуроназу PG1. При этом экзо- β -1,3-глюканаза и α -амилаза при культивировании на ЛЦ среде либо не продуцировались вовсе, либо уровень их секреции был недостаточен для идентификации. Таким образом, нами было показано, что при культивировании на ГП и ЛЦ средах в КЖ гриба секретируются различные наборы гликолитических ферментов.

В процессе глубинного роста *T. hirsuta*, помимо продукции целлюбиогидролазы была идентифицирована экзо- β -1,3- глюканаза, которая способна отщеплять ди- и тетра-сахариды с концов глюкановых цепей. При стационарном культивировании экзо- β -1,3-глюканаза не была найдена, однако удалось идентифицировать фермент эндо- β -1,3-глюканазу, который, вероятно, катализирует разрывы внутри цепи целлюлозы, таким образом, нарушая ее кристаллическую структуру и облегчая дальнейшую деградацию [267]. Также существует гипотеза, что β -1,3-глюканазы в качестве ферментов, способных лизировать клеточную стенку, необходимы для морфогенеза базидиальных грибов [268]. В то же время, экзо- β -1,3-глюканазы функционально могут быть заменены несколькими гликозидазами, продуцируемыми на ЛЦ средах.

Продукция вспомогательных и дополнительных белков

В секретоме базидиальных грибов, помимо ферментов лигноцеллюлозного комплекса, обнаружено значительное количество разнообразных ферментов протеолитического действия [249], особенно это характерно для роста на сложных субстратах. При этом их содержание в составе секретомов может достигать 20% от общего белка [269]. Тем не менее, роль протеаз в деградации лигноцеллюлозных субстратов четко не определена и часто недооценивается. Предполагается, что секреция протеолитических ферментов регулируется соотношением источников углерода и азота, и

активируется при низком содержании доступных азотсодержащих соединений [6]. Таким образом, в наших экспериментах с высокой концентрацией азота в среде, ожидалось, что продукция протеаз будет не высокой. Действительно, удалось обнаружить только один протеолитический фермент - протеазу семейства S53, который продуцировался на ГП среде, по крайней мере, в течение 8 дней культивирования, и уровень его продукции увеличивался в присутствии CuSO_4 . Стоит отметить, что на ЛЦ среде этот фермент не продуцировался, что, возможно, связано с ингибированием продуктами деградации лигноцеллюлозы. В то же время, при культивировании на ЛЦ среде, отмечалась продукция аспаратпептидазы, относящейся к семейству протеаз с широкой субстратной специфичностью, так как эти ферменты, как правило, способны расщеплять дипептидные связи, включающие гидрофобные остатки.

Существующие данные свидетельствуют, что экспрессия протеаз четко регулируется, таким образом, различные протеазы, вероятно, продуцируются на различных стадиях развития организма и в различных условиях роста. Как было показано, грибные протеазы способны работать в широком диапазоне pH [270], но на данный момент конкретные субстраты для обеих протеаз предложить невозможно.

Существуют различные гипотезы о роли протеаз в секретах базидиомицетов. Например, ранее сообщалось, что LiP подвергается деградации протеазой-посредником у гриба *Phanerochaete chrysosporium* в условиях культивирования на синтетической среде [271], однако остается неясно происходит ли аналогичная деградация при колонизации субстрата в природе. Также, было показано, что протеазы могут участвовать в активации функциональных доменов целлобиозодегидрогеназы [272–274]. Предполагается, что аспарагиновая протеаза гриба-патогена растений *Botrytis cinerea* является одним из факторов вирулентности гриба, способная нейтрализовать защитные белки растений, секретируемых в ответ на колонизацию [275,276]. Таким образом, внеклеточные грибные протеазы являются мультифункциональными ферментами, выполняющими различные функции.

Продукция церато-платанинов

При культивировании *T. hirsuta* на ЛЦ среде в секретах нами было идентифицировано значительное количество церато-платанинов (Рис.12, Таблица 6). Церато-платанины представляют собой низкомолекулярные белки с экспансин-подобной активностью, способные разрушать нековалентные связи в полисахаридах клеточной стенки, но не обладающие гидролитической активностью [277]. Они способны вызвать фрагментацию кристаллической целлюлозы и разрыв хлопкового волокна [277]. Кроме

того, предполагается, что некоторые из этих белков могут иметь важное значение для патогенной активности грибов [278].

Гены, кодирующие церато-платанины, были найдены в геномах многих грибов [279], так же была получена некоторая информация о свойствах этих белков [249,280]. Ориентируясь на локализацию церато-платанинов в клетке гриба, они должны выполнять по крайней мере две роли: первой (как правило, называемой главной) - является участие в росте и развитии организма, вторая роль должна объяснять их секрецию вне клетки и взаимодействие с растениями [281,282]. Наше исследование показывает, что церато-платанины, по всей видимости, вовлечены в деградацию полимерной структуры клеточной стенки растений и специфически индуцируются при культивировании *T. hirsuta* на природном лигноцеллюлозном субстрате. Важно также отметить, что они активно продуцировались в начале культивирования, т.е. их индукция была вызвана первыми продуктами деградации субстрата и, таким образом, они способны активировать дальнейшее разрушение клеточной стенки растений.

Выводы к разделу 3.1.:

Секретом *T. hirsuta* при росте на ГП среде и лигноцеллюлозном субстрате представлен в основном ферментами лигнолитического и целлюлолитического действия.

Оксидоредуктазы представляют наиболее обширную группу среди секретируемых ферментов *T. hirsuta*, при этом, множественные изоформы/изоферменты лакказ и марганец-независимых пероксидаз играют основную роль в формировании ЛМС. Основным изоферментом, продуцируемым *T. hirsuta* в виде нескольких изоформ, на всех исследуемых средах, являлся изофермент LacA. На более поздних этапах поверхностного культивирования на ЛЦ среде была обнаружена продукция еще одного изофермента, что может быть связано с накоплением специфических индукторов, по-видимому, представляющих собой продукты деградации лигнина.

Продукция MnP и LiP у *T. hirsuta* значительно снижена по сравнению с другими изученными базидиомицетами. Внесение ионов меди при культивировании резко увеличивало активность и продукцию лакказ и арилалкогольоксидазы и, в то же время, оказывало ингибирующее действие на продукцию других секретируемых белков.

T. hirsuta продуцирует лишь незначительное количество гликозид-гидролаз и пептидаз, считающихся основными группами внеклеточных ферментов грибов-возбудителей белой гнили древесины. Впервые показано, что базидиомицет *T. hirsuta* секретирует значительное количество церато-платанинов в ответ на внесение в среду культивирования лигноцеллюлозы, что указывает на участие этих белков в деградации лигноцеллюлозных

субстратов. Изменение условий культивирования гриба (переход с синтетической среды на лигноцеллюлозный субстрат) не только вызывает увеличение спектра продуцируемых ферментов, но также обеспечивает эффективную регуляцию экспрессии и продукции ферментов, отвечающих за деградацию природного субстрата, в том числе и спектра секретируемых лакказ.

3.2. Изучение профилей протеома *T. hirsuta*, изменяющихся в ответ на индукцию лакказ медью и при росте на лигноцеллюложном субстрате

Не смотря на то, что в основном выделенные и охарактеризованные лакказы являются внеклеточными ферментами, известно о существовании и внутриклеточных форм. Большинство видов возбудителей белой гнили древесины изученные в работе [283] продуцировали как внеклеточные, так и внутриклеточные изоферменты лакказ с схожей субстратной специфичностью и pI. Аналогичные данные были получены для *Trametes versicolor* при культивировании на средах, содержащих глюкозу и лигноцеллюлозные субстраты [113], а так же для *Agaricus bisporus* [114]. При этом значительная часть ферментативной активности обнаруживалась в культуральной жидкости (95-98% от общей, в зависимости от среды, а в случае *A. bisporus* – 88%) и лишь следовая активность отмечалась во внутриклеточных экстрактах. Было выдвинуто предположение, что внутриклеточные лакказы у грибов и периплазматические лакказы у бактерий участвуют в преобразовании низкомолекулярных фенольных соединений в клетке, например при пигментации клеток [92,116]. На данный момент не ясно, представляют ли внутриклеточные и секретируемые лакказы грибов два отдельных пула, или же внутриклеточные ферменты являются внеклеточными формами в процессе секреции. Ответ на этот вопрос могут дать сравнительные протеомные исследования - один из эффективных подходов к изучению процессов биосинтеза ферментов.

Несмотря на достоинства методов протеомного анализа, исследование процессов биосинтеза лакказы в базидиальных грибах осложняется отсутствием достаточного количества аннотированных геномов базидиомицетов, вызывающих белую гниль древесины, что затрудняет идентификацию белковых компонентов. Однако возможность регуляции биосинтеза лакказы с помощью различных индукторов делает возможным применение дифференциальной протеомики, позволяющей определить основные белковые компоненты, вовлеченные в биосинтез фермента, за счет разницы профилей секреторных и внутриклеточных белков, полученных при культивировании микроорганизма на средах с добавлением и без добавления индуктора. Таким образом,

сравнительный анализ, выявление и идентификация белков гриба *Trametes hirsuta*, изменяющихся в ответ на внесение в питательную среду сульфата меди при помощи подхода дифференциальной протеомики позволяет подтвердить спектр потенциальных ассистентов биогенеза лакказ, а так же изучить их на белковом уровне.

3.2.1. Оптимизация пробоподготовки мицелия *T. hirsuta* для исследования протеома

Для идентификации отдельных белков методами масс-спектрометрии необходимо получение двумерных электрофореграмм хорошего разрешения, что представляет для исследователей значительную сложность вследствие физиологических и метаболических особенностей мицелиальных грибов. Прочная клеточная стенка базидиальных грибов затрудняет экстракцию белковых компонентов цитозоля, а высокое содержание пигментов и связанных с внутриклеточными белками меланинов и других метаболитов приводят к получению нечеткой картины распределения белковых компонентов. Следует отметить, что методики получения внутриклеточных белков базидиомицетов зависят от исследуемого штамма и достаточно индивидуальны. Поэтому для получения внеклеточных белков *T. hirsuta* использовали различные методы разрушения мицелия и экстракции внутриклеточных белков: разрушение мицелия в жидком азоте [219], гомогенизация в буферном растворе [284], а так же подбор экстрактанта.

Основным показателем эффективности процесса разрушения мицелия является степень извлечения белковых компонентов, а так же сохранение их нативных физико-химических показателей (Mr, ИЭТ). Сравнение методов разрушения биомассы показало, что наиболее эффективным подходом является механическая гомогенизация. При этом количество белковых компонентов возрастало в 1,44 раза (с 350 до 502 белков на электрофореграммах, среда ГП/Cu²⁺) и в 1,26 раза (с 438 до 552 белков на электрофореграммах, среда ГП) при механической гомогенизации, по сравнению с разрушением в жидком азоте (Рис. 13).

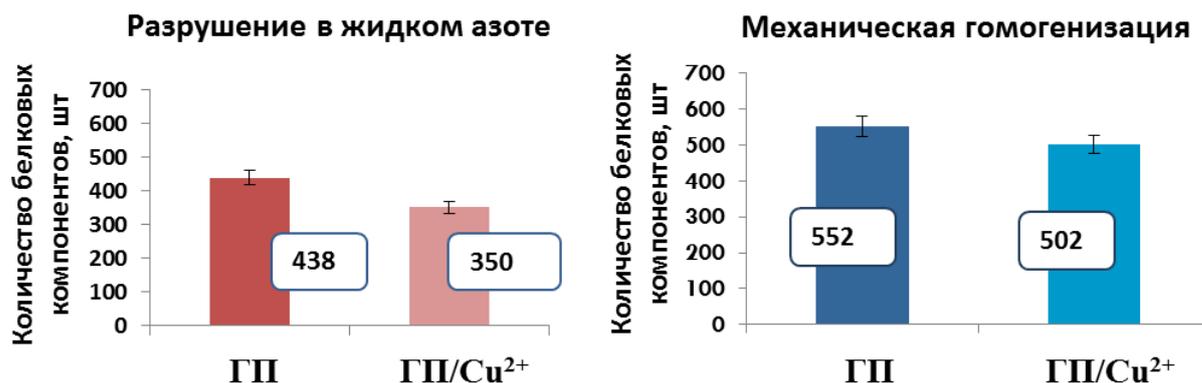


Рис. 13. Сравнение методов разрушения мицелия *T. hirsuta* для получения образцов для протеомных исследований. ГП – глюкозо-пептонная среда, ГП/Cu²⁺ - глюкозо-пептонная среда с индуктором CuSO₄. На графиках приведено количество белковых компонентов, разделенных на электрофореграммах (рассчитано при помощи ПО ImageMaster 2D Platinum)

Кроме того, использование механической гомогенизации для разрушения мицелия позволило получить двумерные электрофореграммы более высокого качества из-за отсутствия горизонтального размытия белковых пятен. Дальнейшее улучшение разрешения белковых компонентов было достигнуто введением дополнительной стадии переосаждения белков смесью ТХУ/ацетон, что обеспечило точность их дальнейшей идентификации. Таким образом, разработанный метод пробоподготовки позволил получить электрофореграммы внутриклеточных экстрактов базидиального гриба *T. hirsuta* с высоким разрешением.

3.2.2. Сравнительный анализ профилей внутриклеточных белков *T. hirsuta* при культивировании на средах различного состава

Протеомный анализ показал, что перекрытие белковых компонентов на электрофореграммах, полученных при культивировании *T. hirsuta* на разных стадиях роста на ГП и ГП/Cu²⁺ средах, составляет 60-65% (Рис.14). Для сравнительного анализа внутриклеточных белковых профилей *T. hirsuta* были выбраны сутки максимальной продукции лакказы. Было показано наличие 5 областей со значительными изменениями белковых профилей (Рис. 14):

- 1) Группа белков с характеристиками: Mr>100кДа кДа; pI – 4,7-5.5;
- 2) Группа белков с характеристиками: Mr=40-60 кДа; pI - 5.0-6.0;

- 3) Группа белков с характеристиками: $M_r=30-40$ кДа; $pI - 5.0-6.0$;
- 4) Группа белков с характеристиками: $M_r=40-50$ кДа; $pI - 4.0-4.5$;
- 5) Группа белков с характеристиками: $M_r=17-25$ кДа; $pI - 4.0-4.5$.

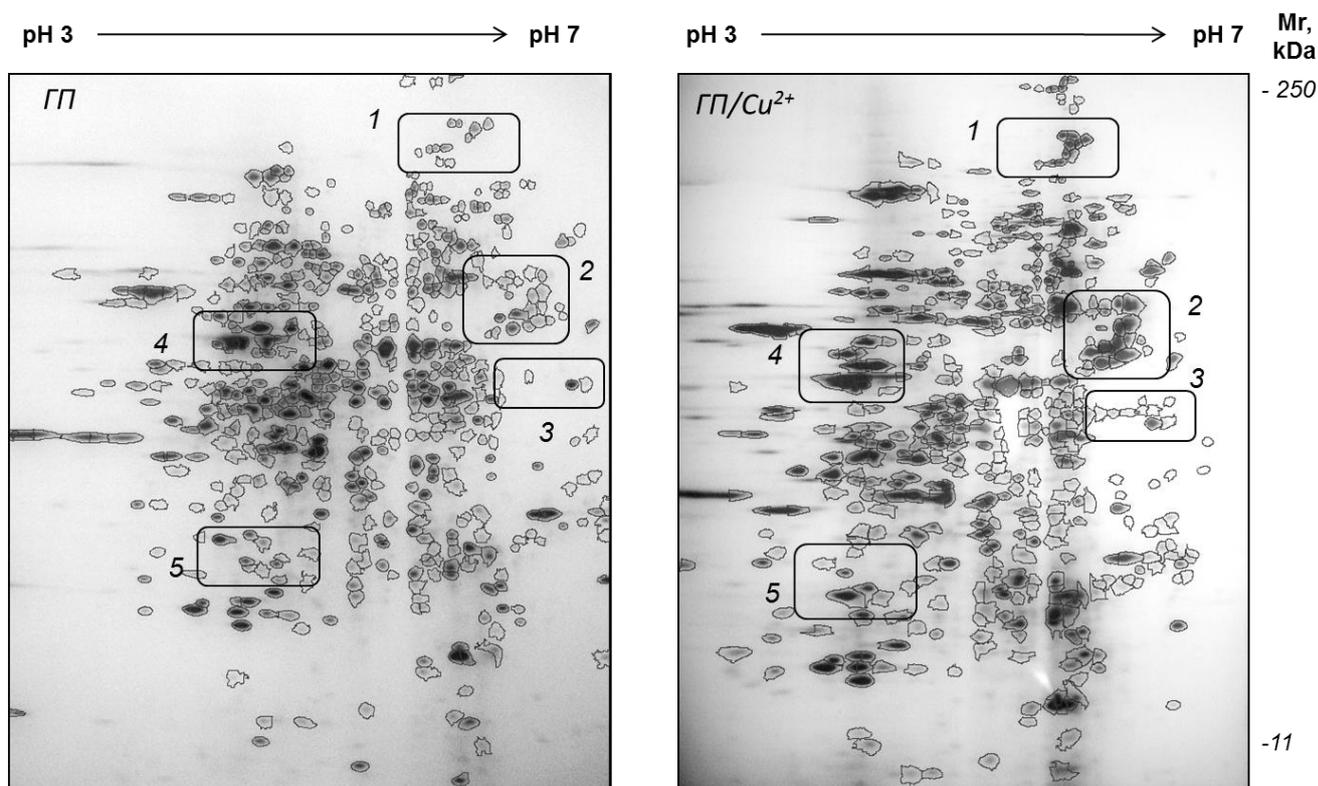


Рис. 14. Двумерные электрофореграммы внутриклеточных белков *T. hirsuta*, полученные при росте базидиомицета на ГП (А) и ГП/ Cu^{2+} (Б) средах. Выделенные участки – наиболее отличающиеся по белковому составу области.

Стоит отметить, что для групп 1, 3, 4 и 5 наблюдаются изменения количества белковых компонентов с незначительными изменениями их интенсивности. В то время как сравнительный анализ белковых профилей группы 2 показал сохранение всех основных белковых компонентов протеомов при культивировании гриба на разных средах (20 белков, рис. 15). Сравнение интенсивности окраски белков внутри области локализации компонентов группы 2 показало значительное ее возрастание при индукции биосинтеза лакказы (табл. 7). Подобная тенденция сохранялась на протяжении всего процесса культивирования (данные не приведены).

Максимальное увеличение интенсивности окраски при добавлении сульфата меди в питательную среду наблюдалось для 7 белковых компонентов, причем варьировалось в диапазоне от 33 до 160 раз (рис.15, табл. 7).

Таблица 7. Изменение интенсивности окраски белковых компонентов группы 2.

№ белка на геле	Увеличение интенсивности, раз*
1	42,9
2	40,9
3	77,2
4	33,4
5	103,7
6	159,95
7	96,4

*рассчитано при помощи ПО ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare)

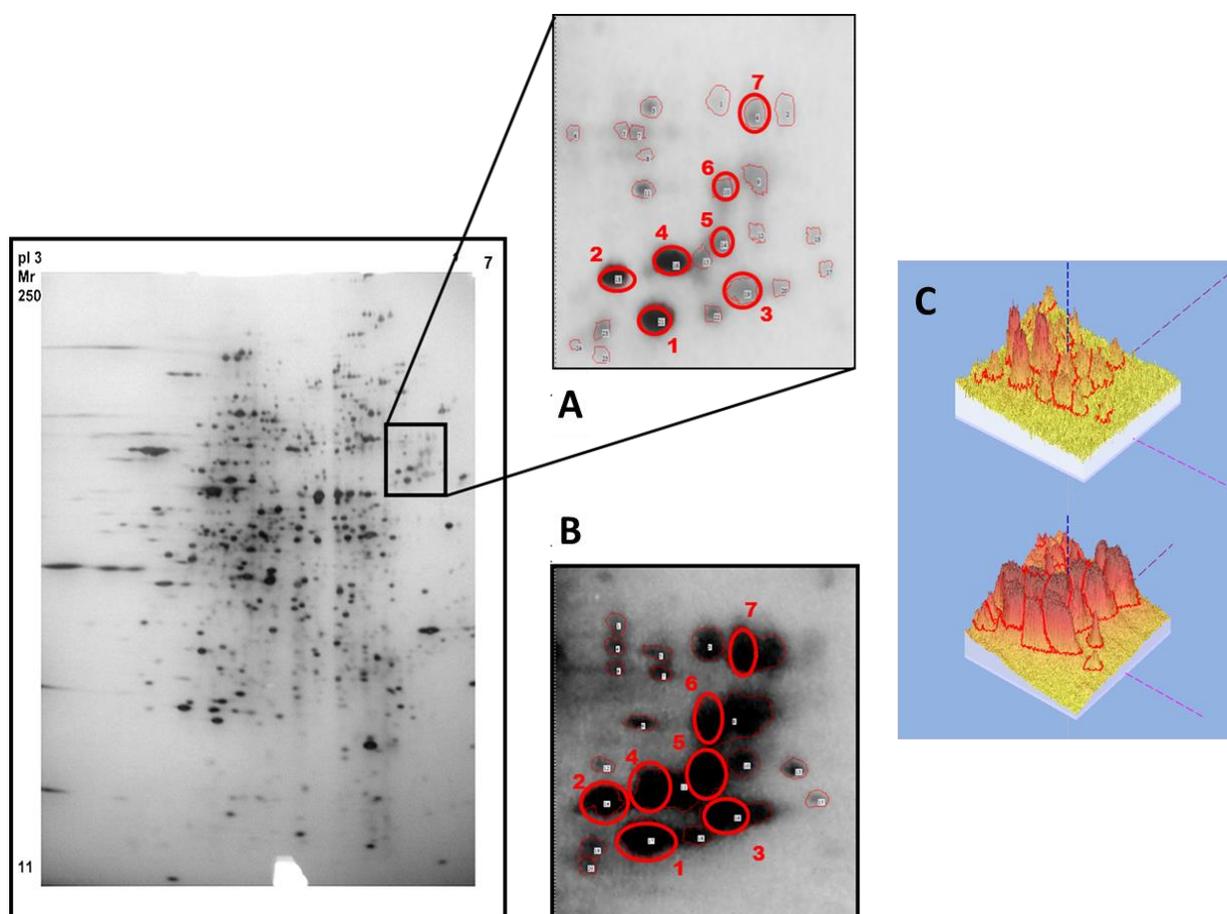


Рис. 15. Сравнение регионов электрофореграмм экстрактов мицелия *T. hirsuta* с наиболее выраженным изменением продукции при внесении CuSO_4 (А – культивирование в отсутствии индуктора; В – культивирование в присутствии индуктора). Трехмерное отображение выделенного участка (С) показывает количественные изменения в составе продуцируемых форм фермента.

Таблица 8. Белки, идентифицированные при помощи MALDI TOF/TOF масс-спектрометрии

№ компонента на фореграмме	Идентифицированный Белок	Микроорганизм	Идентификационный номер в базе данных NCBI	Расчетная молекулярная масса, кДа	Расчетная ИЭТ	Score	E value
1	н/д						
2	ATP2, beta subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase	<i>Serpula lacrymans</i>	gi:336367226	57808	5,41	140	1.6e-07
3	н/д						
4	ATP2, beta subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase	<i>Serpula lacrymans</i>	gi:336367226	57808	5,41	134	6.2e-07
5	н/д						
6	Chaperone activator Sti1	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	gi:212002899	64270	5,65	50	9
7	н/д						

Для данных белков был выполнен масс-спектрометрический анализ. Идентификацию белков методом PMF проводили по базам данных, включающим белки всех известных представителей царства грибов, в том числе дрожжей, аскомицетов и базидиомицетов, для которых существуют секвенированные геномы. При помощи межвидового поиска удалось идентифицировать только 2 белка гриба *T. hirsuta* (табл. 8): два из них были гомологичны β -субъединицам АТФ-синтазы ранее определенных для *Serpula lacrymans*. На белковых картах отчетливо видно разделение этих двух компонентов (образцы 2 и 4), ΔpI которых составляет 0,13, что позволяет предположить продукцию двух изоформ данного белка у *T. hirsuta*. Так же один из белков был идентифицирован как гомолог активатора шаперонов *Sti1*, регулирующего скорость каталитического цикла ферментов семейства HSP.

Прочие белки достоверно идентифицировать не удалось, что может быть связано с недостатком информации по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям для базидиальных грибов и близкородственных им микроорганизмов [285]. Кроме того, низкий скор отдельных образцов может быть так же обусловлен наличием посттрансляционных модификаций, которые в свою очередь способны влиять на результаты идентификации. Однако стоит отметить, что масс-спектры образцов 1, 3, 5 и 7 близки между собой, что может свидетельствовать о высокой степени идентичности данных образцов.

Для повышения уровня идентификации белков так же был использован другой метод - секвенирование *de novo* отдельных пептидов по спектрам их фрагментации. Проведенное секвенирование пептидов белкового образца №1 в диапазоне молекулярных масс 1000-3500Да позволило получить отдельные пептиды, а так же провести их дальнейшую идентификацию при помощи BLAST-p. (табл. 9).

Таблица 9. Масс-спектрометрическое *de novo* секвенирование пептидов образца №1

Масса пика	Соответствующая последовательность пептида	Результаты поиска BLASTp	Микроорганизм	E value
1323	QLLWNYYYPVK	-	-	-
1423	TWGTVNQLFTSLR	-	-	-
1514	LFPGLSAANPKGTNK	-	-	-
1688	SSSGGFNWVNDNFGGSR	-	-	-
2801	PNNQTATSDEYED	HSP70 (Ssa)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.001
3426	HFSEPETSQD	-	-	-

Выравнивание аминокислотных последовательностей пептидов по белковым базам данных при помощи алгоритмов Blast-p (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) показало высокую степень гомологии одного из пептидов (пик – 2801, последовательность – PNNQTATSDEYED) с последовательностью молекулярного шаперона HSP70 – АТФ-зависимым белком, уровень продукции которого связан с условиями культивирования организма. Таким образом, можно предположить, что белки 1, 3, 5 и 7 являются молекулярными шаперонами группы HSP70.

Протеомный анализ внутриклеточных белков штамма *T. hirsuta* на разных стадиях роста в процессе его культивирования на лигноцеллюлозной среде показал, что для ЛЦ среды значительных отличий в профиле внутриклеточных белков при культивировании на среде без индуктора и с индуктором не выявлено (Рис. 17). На протяжении всего процесса культивирования количество компонентов белковых карт изменялось в незначительных пределах, при этом перекрытие белковых профилей составляло практически 90% от общего числа компонентов. Тем не менее, была выделена сильнощелочная низкомолекулярная область, включающая белки ($M_r = 11-17$ кДа, pI около 9.0) увеличивающие продукцию в процессе культивирования базидиомицета, что коррелирует с динамикой роста активности лакказы в культуральной жидкости гриба. Однако, масс-спектрометрический анализ этих компонентов не позволил выявить значимую гомологию с последовательностями, находящимися в базах данных, а следовательно их идентификация на данный момент невозможна.

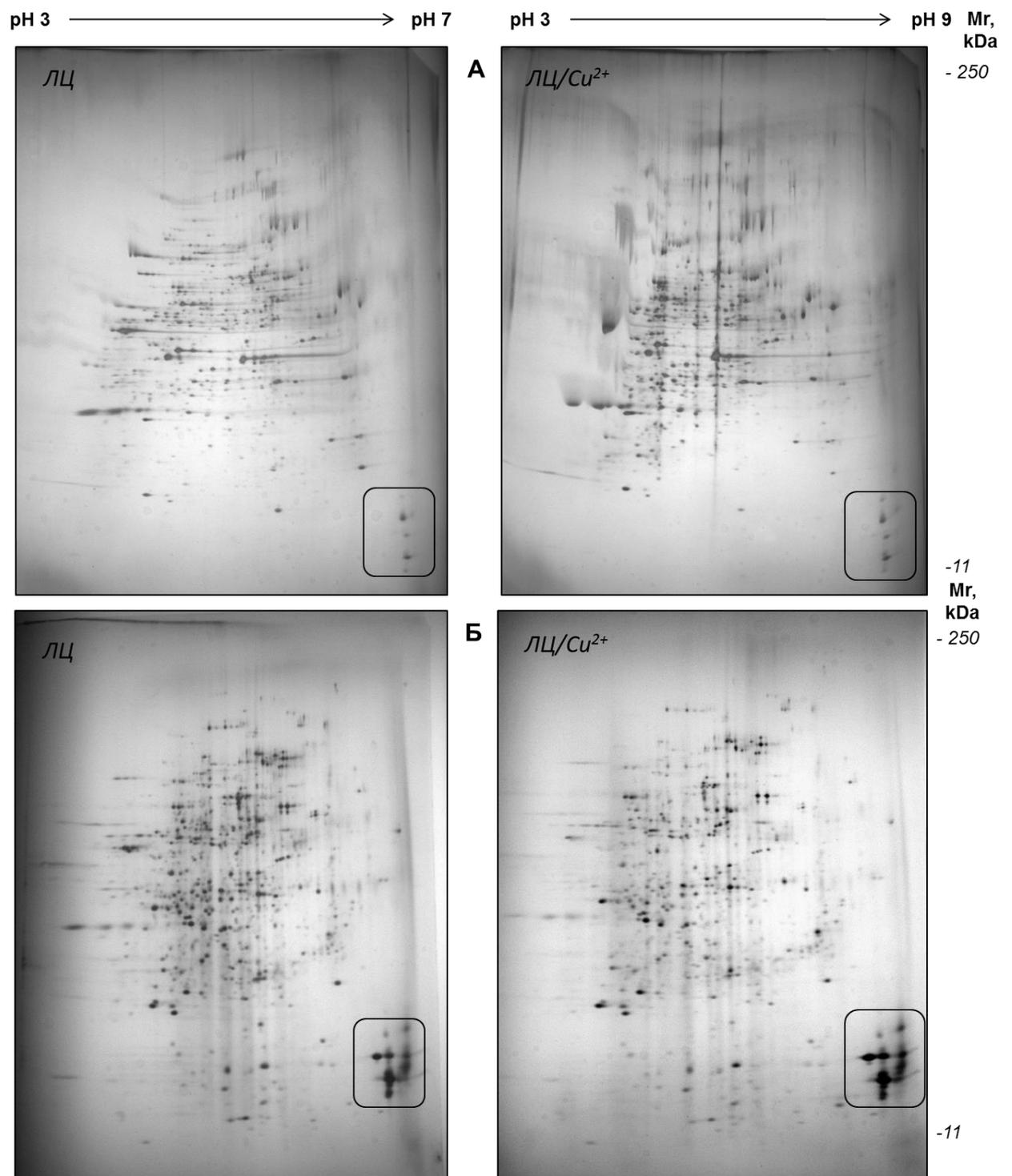


Рис. 17. Двумерные электрофореграммы внутриклеточных белков *T. hirsuta*, полученные при росте базидиомицета на ЛЦ и ЛЦ/Cu²⁺ средах (А - 21 сутки культивирования, Б - 69 сутки культивирования). Выделенные участки – области с количественным увеличением компонентов в процессе культивирования базидиомицета.

Выводы к разделу 3.2.:

Используя подход дифференциальной протеомики, основанный на анализе отличий в белковых профилях гриба *T. hirsuta* при культивировании на разных средах, удалось идентифицировать 4 белка, значительно увеличивающих свою продукцию при культивировании гриба на среде ГП/Cu²⁺. Данные отличия были обусловлены изменениями внутриклеточных процессов в ответ на внесение индуктора в питательную среду. Достоверно были определены 2 изоформы АТФ-синтазы (параметр достоверности score >83). Так же, как вероятные (параметр достоверности score >50) идентифицированы белки группы молекулярных шаперонов Hsp70, участвующие в различных внутриклеточных процессах, в частности, связанных с синтезом и фолдингом различных белков [286,287] и активатор шаперонов Sti1, регулирующий скорость каталитического цикла шаперонов. Как было показано ранее, активатор шаперонов Sti1 в комплексе Ssa1-Sti1-Hsp90 способен влиять на АТФазную активность Ssa, увеличивая скорость гидролиза АТФ до 200 раз [288], тем самым, увеличивая скорость каталитического цикла шаперона.

Вероятно, добавление в питательную среду сульфата меди вызывает ответную реакцию гриба *T. hirsuta*, целью которой является скорейшее выведение ионов меди за пределы клетки, в том числе с помощью дополнительной продукции лакказ и других медь-содержащих ферментов. При этом возникает необходимость в увеличении количества белков-ассистентов, регулирующих процесс их фолдинга и секреции. Однако на среде, содержащей лигноцеллюлозный субстрат, ионы меди аналогичного влияния не оказывали. Большинство внутриклеточных белков сохраняло уровень продукции как в отсутствии ионов меди, так и при их внесении в среду культивирования. Этот эффект, вероятно, связан с тем, что ионы меди сорбируются субстратом (соломой) и не попадают в клетку и в хелатированном виде оказывают меньшее влияние на внутренний статус клетки.

Среди белков, изменяющих уровень продукции, не были выявлены внутриклеточные лакказы, что вероятно, связано с низкой их представленностью, как на уровне белковых продуктов, так и на уровне транскриптов или же специфической регуляцией синтеза белка, не реализуемой в исследуемых условиях.

3.3. Сравнительный анализ данных тотальных транскриптомов в ответ на внесение ионов меди

В ходе анализа профилей секреции удалось выявить 2 изофермента лакказ, секретлируемых грибом в условиях индукции биосинтеза этого фермента: внесения ионов меди и при культивировании на среде, содержащей лигноцеллюлозный субстрат. Их

продукция в значительной степени зависела от вносимого индуктора, а также фазы роста микроорганизма, что подразумевает дифференциальную регуляцию экспрессии генов. Однако, по литературным данным, у грибов - ближайших родственников *T. hirsuta*, таких как *T. versicolor*, *T. cinnabarina*, *Trametes pubescens* количество генов лакказ значительно превышало 2 и составляло от 5 до 7 последовательностей, формирующих мультигенное семейство. В связи с чем, для определения генов, составляющих мультигенное семейство лакказ у *T. hirsuta* было решено провести анализ тотального транскриптома в условиях индукции лакказ ионами меди.

3.3.1. Супрессионная вычитающая гибридизация для исследования мультигенного семейства лакказ *T. hirsuta*

Мультигенные семейства представляют собой группу генов, близкогомологичных по своим нуклеотидным последовательностям и обладающих близкими или перекрывающимися фенотипическими функциями, представленную в геноме множеством сходных копий.

В настоящее время существует несколько подходов к изучению структурно-функциональной организации мультигенных семейств, содержащихся в геномах организмов. В основном эти подходы включают в себя методы молекулярного клонирования, рестрикционного анализа, блот-гибридизации ДНК и РНК, гибридизации *in-situ* метафазных хромосом и гистологических срезов тканей с клонированными ДНК-зондами. Зачастую все они сопряжены с использованием секвенирования нового поколения (NGS).

Т.к. для базидиальных лакказ показана значительная индукция ионами меди было решено использовать в работе метод супрессионной вычитающей гибридизации кДНК с дополнительным этапом зеркально-ориентированной селекции транскриптов, сочетание этих методов позволяет выявлять дифференциально экспрессирующиеся гены, в том числе малопредставленные транскрипты. Принцип метода более подробно описан в разделе «Материалы и методы».

В качестве модельной системы для продукции внеклеточных лакказ нами было выбрано глубинное культивирование мицелия *T. hirsuta* на синтетической глюкозо-пептонной среде (ГП). Ранее в ряде работ было показано, что данный способ культивирования позволяет достичь увеличения продукции фермента [210,237], в особенности при внесении в среду культивирования вносили сульфат меди.

Исследование динамики активности лакказы при глубинном культивировании гриба *T. hirsuta* на средах ГП и ГП/ Cu^{2+} показало, что продукция лакказы детектировалась

в КЖ на третьи сутки при росте гриба на среде ГП. Следует подчеркнуть, что на среде с индуктором активность лакказы в этот же момент была выше в 25 раз (0,81 U/мл и 21,7 U/мл соответственно). Далее разница в активности лакказы при росте на ГП и ГП/Cu²⁺ средах сокращалась до 8-10 раз. На основании этих результатов для сравнительного анализа транскриптомов использовали 3-х суточный мицелий гриба – период наиболее выраженных различий между образцами.

Препараты суммарной РНК были получены из мицелия *T. hirsuta* при культивировании на ГП среде без индуктора и в присутствии CuSO₄. Качественный и количественный анализ образцов показал, что в результате выделения и последующей очистки они могут быть использованы для сравнительного анализа экспрессии транскриптов (рис. 18), поскольку на электрофореграмме четко идентифицируются фракции рибосомальных РНК.

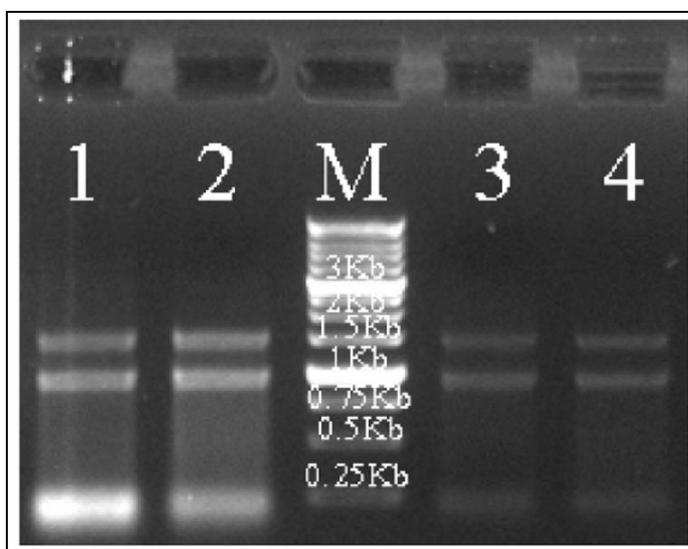


Рис. 18. Электрофореграмма образцов суммарной РНК. 1 – суммарная РНК образцов, выращенных на среде с медью; 2 – суммарная РНК образцов, выращенных на среде без меди; 3 – суммарная РНК образцов, выращенных на среде с медью, после очистки; 4 – суммарная РНК образцов, выращенных на среде без меди, после очистки; М – 1kb ДНК маркер.

Уровень транскрипции генов может варьировать в широких пределах, и некоторые транскрипты могут быть мало представленными в суммарном пуле мРНК. Поэтому для поиска генов лакказ в дополнение к супрессионной вычитающей гибридизации мы применили метод зеркально-ориентированной селекции генов (MOS) – что позволило не только создать высококачественные дифференциальные библиотеки кДНК, но и решить одну из самых основных и общих проблем всех методов анализа кДНК, а именно – проблему потери редко представленных транскриптов в получаемых библиотеках [224,289].

Образцы мРНК использовали для создания библиотек кДНК после процедуры вычитающей гибридизации (образцы «SSH-Cu-» и «SSH-Cu +»), а так же 2 библиотеки были сконструированы при сочетании SSH и MOS (образцы «MOS-Cu-» and «MOS-Cu +»), представляющие собой расширенный набор транскриптов, экспрессируемых *T. hirsuta*. Для приготовления библиотек кДНК, обогащенных полноразмерными последовательностями, использовали модифицированную технологию SMART. Для синтеза кДНК использовали праймер, фланкированный в 3'-концевой области последовательностью, содержащей поли(Т) последовательность, разбитую несколькими С и G нуклеотидами. Использование такого праймера позволяет избежать проблем при секвенировании гомополимерных участков.

Для выравнивания концентраций транскриптов так же была проведена нормализация и деплеция кДНК. Эти процедуры позволяют выровнять концентрации различного типа молекул в образцах кДНК, тем самым снизить уровень высокопредставленных транскриптов, таких как рибосомальные и транспортные РНК, с сохранением относительной представленности других транскриптов. Таким образом, использование этих процедур позволяет сохранить соотношение концентраций средних и редких транскриптов. На рисунке 19 представлены результаты нормализации и деплеции библиотек кДНК.

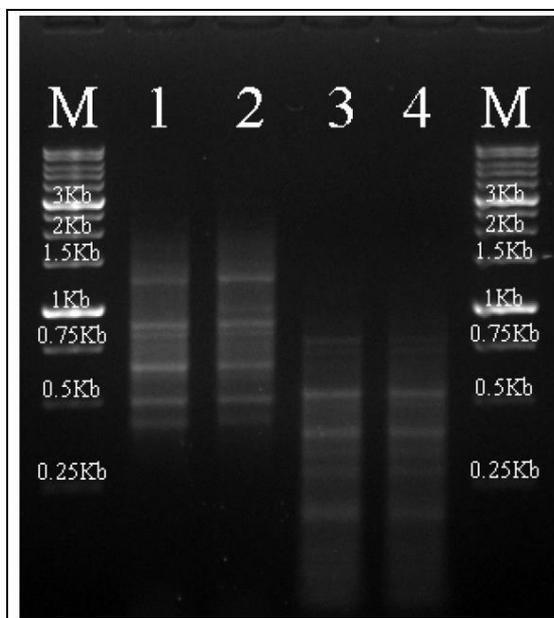


Рис. 19. Электрофореграмма полученных образцов кДНК и продуктов гидролиза *RsaI*. 1 – SMART-амплифицированная кДНК, образец ГП/Cu²⁺; 2 – SMART-амплифицированная кДНК, образец ГП; 3 – гидролизованная *RsaI* кДНК, образец ГП/Cu²⁺; 4 - гидролизованная *RsaI* кДНК, образец ГП; М – 1kb ДНК маркер.

Сравнительный анализ образцов кДНК, полученных в результате применения различных стадий вычитающей гибридизации представлен на рисунке 20. Как видно из представленных результатов, использование зеркально-ориентированной селекции увеличивает концентрацию дифференциально экспрессируемых генов. При использовании последовательных процедур вычитающей гибридизации также происходит уменьшение представленности высокоэкспрессируемых генов, таких как гены рибосомальных и транспортных РНК с сохранением представленности всех транскриптов в исследуемых образцах.

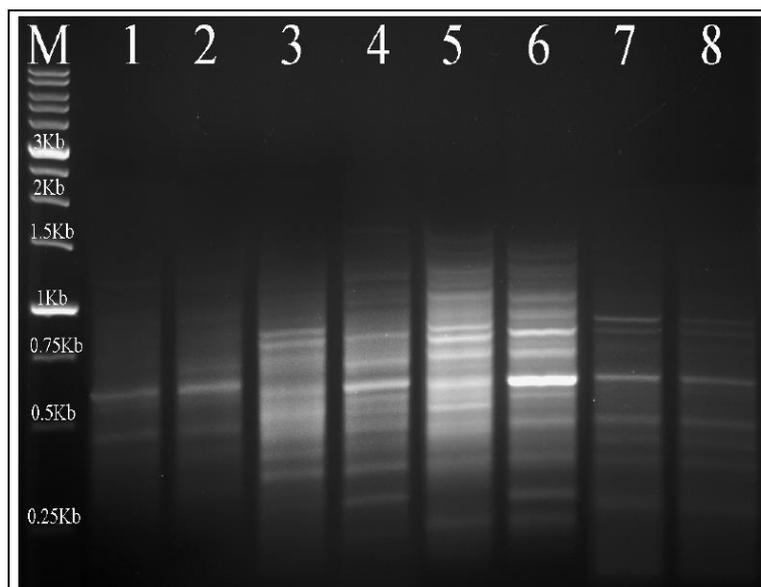


Рис. 20. Электрофореграмма продуктов первичной и вторичной ПЦР, а так же результаты после зеркально-ориентированной селекции (MOS). 1 – первичная ПЦР ГП/Cu²⁺ вычтенного образца; 2 – первичная ПЦР ГП вычтенного образца; 3 – вторичная ПЦР ГП/Cu²⁺ вычтенного образца; 4 - вторичная ПЦР ГП вычтенного образца; 5 – MOS ПЦР ГП/Cu²⁺ вычтенного образца; 6 - MOS ПЦР ГП вычтенного образца; 7 – невычтенная кДНК, образец ГП/Cu²⁺; 8 – невычтенная кДНК, образец ГП. М – 1kb ДНК маркер.

3.3.2. Секвенирование библиотек кДНК и сборка транскриптомов

Далее, полученные образцы кДНК после вычитающей гибридизации (два образца SSH-Cu⁺ and SSH-Cu⁻ непосредственно после вычитающей гибридизации и два образца MOS-Cu⁺ and MOS-Cu⁻, полученные с использованием дополнительного этапа вычитания – зеркально-ориентированной селекции) были использованы для создания библиотек для широкоформатного параллельного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 2000. В результате секвенирования 4х полученных библиотек было получено 98,934,807 одноконцевых прочтений, каждое длиной ок 100 пн.

Низкокачественные прочтения нуклеотидов концевых последовательностей, а также праймеры и адаптеры, были удалены перед сборкой транскриптома. Сборку транскриптома осуществляли с помощью ПО Trinity, выбор которого обусловлен литературными данными: показано, что это лучшая программа-ассемблер k-меров, особенно в отсутствии референсного генома [290]. Следует отметить, что анализируемые образцы РНК характеризуется высокой сложностью и сходством, поскольку сравнительный анализ транскриптомов проводится для одного и того же объекта - базидиального гриба *T. hirsuta*, выращенного в разных условиях (в присутствии или отсутствии ионов меди). Преимуществом ПО Trinity является то, что программа позволяет реконструировать ряд изоформ, которые имеют незначительные вариации, такие как, SNPs, небольшие вставки или делеции. Эти вариации вносят избыточность в результаты сборки транскриптома, поэтому короткие избыточные контиги удаляли, но только в том случае, когда они полностью были покрыты за счет других контигов с идентичностью более чем 99%. В результате удалось получить 53 360 контигов, а после удаления из их числа высокоидентичных последовательностей осталось 39 073 контигов, используемых для подсчета основной статистики сборки, и для последующего анализа.

3.3.3. Анализ результатов SSH с помощью ПО BLAST to GO

Для анализа полученных баз данных транскриптов использовали программное обеспечение Blast to GO (<https://www.blast2go.com/>), позволяющее единовременно идентифицировать и аннотировать значительный объем данных.

Всего в работе было получено и проанализировано более 30 000 транскриптов, изменяющих уровень экспрессии при культивировании в условиях индукции биосинтеза лакказ – при внесении ионов меди в среду культивирования. Полученные в ходе секвенирования транскриптомные данные аннотировали на основе гомологии белковых последовательностей.

Функциональную аннотацию проводили в 3 этапа: поиск гомологичных последовательностей с помощью алгоритмов BLAST, картирование транскриптов для установления генной онтологии и аннотация транскриптов для выбора достоверных функций. При этом были использованы различные базы данных: GO, Enzyme Codes, InterPro и KEGG библиотеки (Табл. 10, Рис. 21).

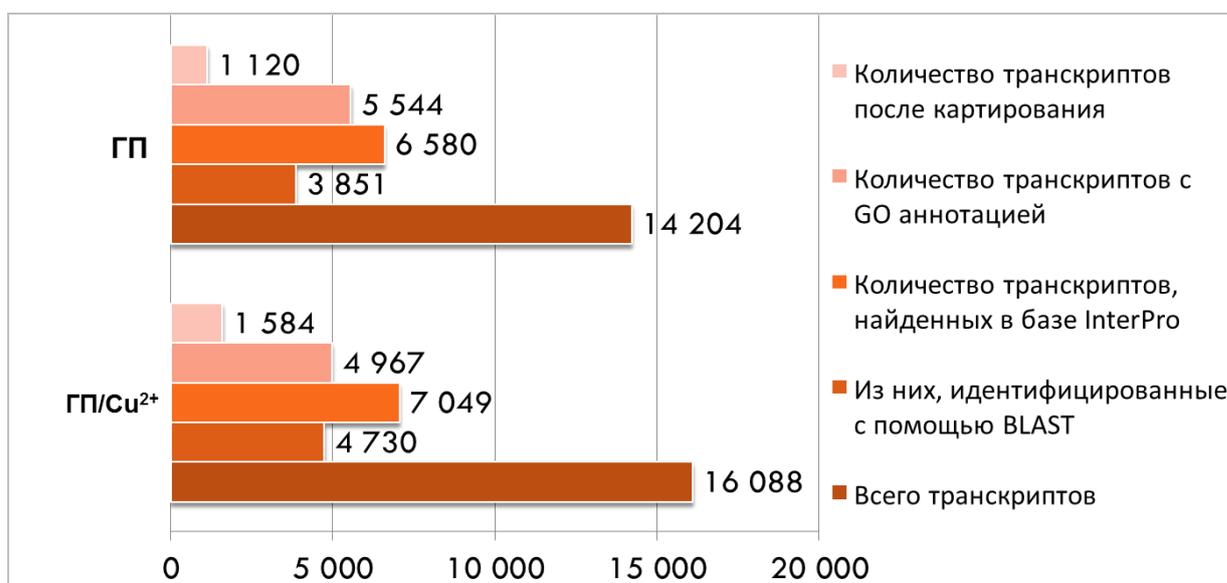


Рис. 21. Статистические характеристики аннотации результатов SSH образцов ГП и ГП/Cu²⁺.

Таблица 10. Статистические характеристики аннотации результатов SSH

	Образец 1 (ГП/Cu ²⁺)	Образец 2 (ГП)
Всего транскриптов	16 088	14 204
Из них, идентифицированные с помощью BLAST	4 730	3 851
Количество транскриптов, найденных в базе InterPro	7 049	6 580
Количество транскриптов с GO аннотацией	4 967	5 544
Количество транскриптов после картирования	1 584	1 120

Для всех собранных последовательностей провели поиск в базе данных «Генной онтологии» (ГО), чтобы классифицировать их предсказанные функции. База данных ГО включает три независимых словаря: молекулярная функция (F), биологический процесс (P) и клеточная локализация (C) [291]. На рис. 22 представлено распределение транскриптов по уровням генной онтологии (2-15 уровень) в зависимости от используемого словаря.

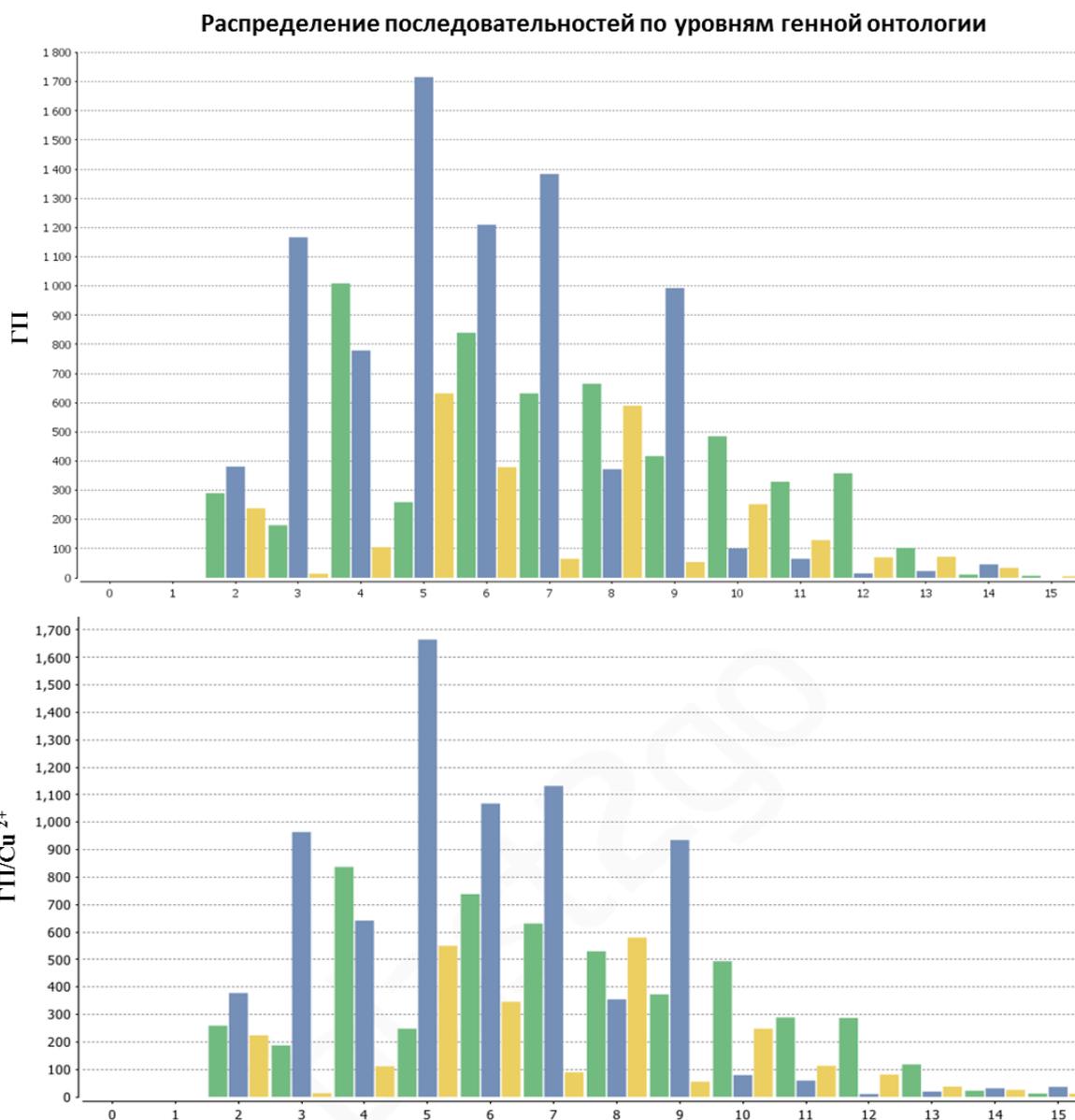


Рис. 22. Распределение идентифицированных транскриптов по уровням ГО. По оси абсцисс – уровни генной онтологии. Условные обозначения:

■ - Процесс
 ■ - Функция
 ■ - Локализация

Для анализа был использован словарь молекулярных функций, уровень 2, т.к. наибольшее количество идентифицированных последовательностей приходится на эту библиотеку, а уровень 2 – высший уровень онтологии, характеризует изменения, происходящие при внесении индуктора наиболее широко.

Согласно анализу категорий генной онтологии и представленности генов в образце ГП и ГП/Cu²⁺ наблюдалась выраженное изменение экспрессии генов, которые выполняют различные молекулярные функции (Рис. 23).

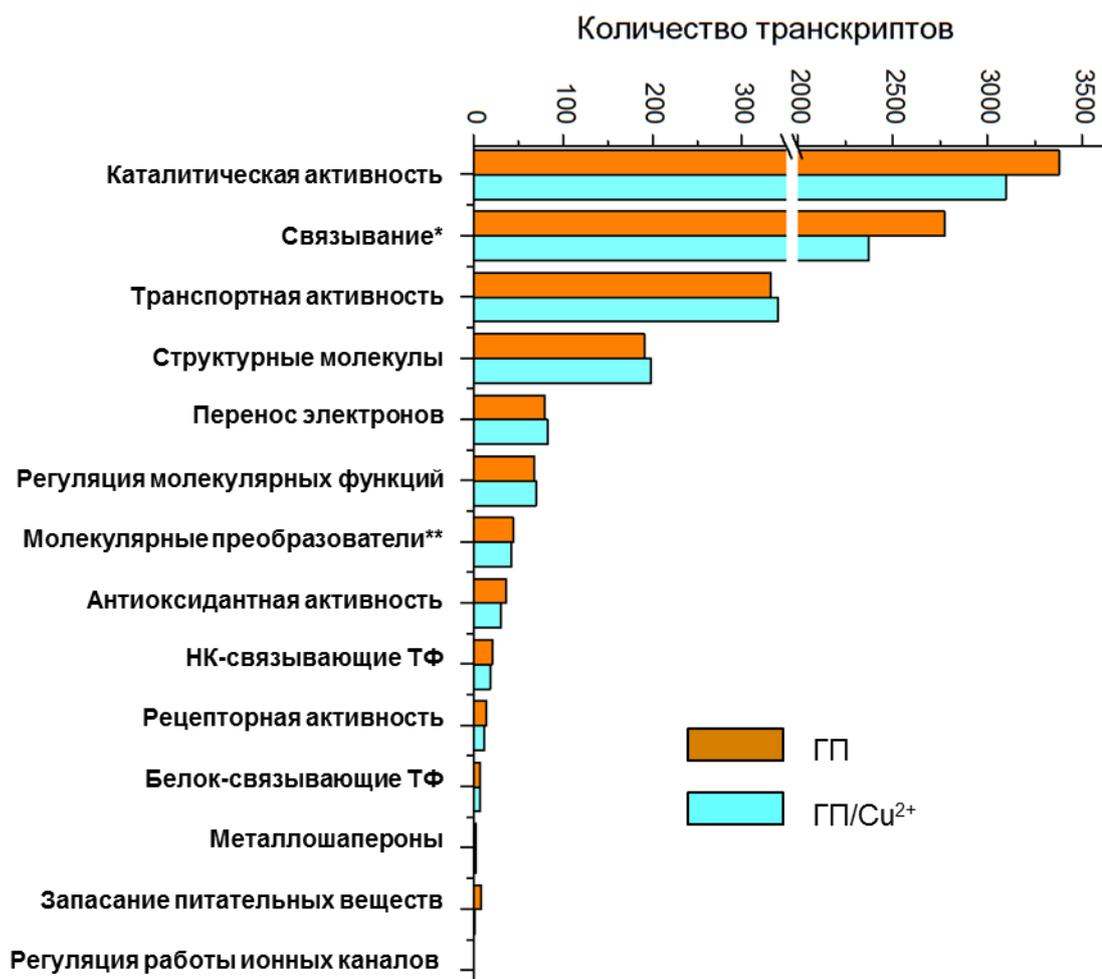


Рис. 23. Распределение транскриптов образца ГП и ГП/Cu²⁺ согласно классификации геной онтологии. *Связывание – белки, осуществляющие селективное, нековалентное, часто стехиометрическое, взаимодействие молекулы с одним или несколькими конкретными участками другой молекулой; **молекулярные преобразователи – белки, способные преобразовывать молекулы из одной формы в другую.

Крупнейшими подкатегориями для обоих образцов в библиотеке "молекулярных функций" были "каталитически активные белки" или ферменты (GO:0003824), а так же «связывающие белки» (GO:0005488), которые включали 89 и 87% всех идентифицированных транскриптов для ГП и ГП/Cu²⁺ образцов соответственно (Рис. 23). В значительной мере представлена группа транспортных белков (GO:0005215, около 5 %) в обоих образцах. Стоит отметить, что среди последовательностей некоторые были идентифицированы как металлошапероны (3 последовательности), а так же транскрипционные факторы, которые могут быть потенциально вовлечены в регуляцию биосинтеза лакказ (около 30 последовательностей). Хотелось бы отметить, что для образца ГП/Cu²⁺ отмечено появление транскрипта, связанного с регуляцией работы ионных каналов в клетке (Рис. 23).

Как видно из результатов проведенного анализа, транскрипты, характеризующиеся высоким относительным уровнем экспрессии, принадлежат к различным группам согласно классификации геномной онтологии.

Согласно проведенному анализу, среди KEGG-библиотек метаболических путей, основное влияние ионы меди на тотальный транскриптом базидиомицета *T. hirsuta*, оказывают в части процессов метаболизма углеводов (Табл. 11). Наибольшее количество идентифицированных и картированных последовательностей принадлежали ферментам цикла трикарбонных кислот (17/16 ферментов пути для ГП и ГП/Cu²⁺ соответственно), гликолиза/глюконеогенеза (19/16 ферментов), пентозо-фосфатного пути (13/12 ферментов), глиоксилатного цикла (11/11 ферментов), а так же путей метаболизма пуриновых (33/29 ферментов) и пиримидиновых (13/12 ферментов) оснований. Это показывает изменения в метаболизме основных циклов углеводного обмена и метаболизма нуклеиновых оснований *T. hirsuta* в присутствии ионов меди в среде.

Таблица 11. Количество идентифицированных ферментов, относящихся к различным метаболическим путям, изменяющих экспрессию при внесении ионов меди в среду культивирования.

	Количество идентифицированных в библиотеках кДНК ферментов метаболического пути (количество последовательностей)	
	ГП	ГП/Cu ²⁺
Цикл трикарбонных кислот	17 (61)	16 (60)
Гликолиз/глюконеогенез	19 (54)	16 (46)
Пентозо-фосфатный путь	13 (38)	12 (34)
Глиоксилатный цикл	11 (37)	11 (31)
Метаболизм пуриновых оснований	33 (232)	29 (212)
Метаболизм пиримидиновых оснований	13 (81)	12 (87)
Синтез аминоксил-тРНК	17 (46)	17 (51)
Окислительное фосфорилирование	4 (38)	4 (36)

Стоит отметить, что до 30% последовательностей не имело гомологов в базе данных метаболических путей. Для всех образцов отмечено большое количество транскриптов – около 10%, кодирующих так называемые гипотетические белки (hypothetical/predicted proteins), точная функция которых неизвестна на данный момент, а также транскрипты, для которых не выявлены белковые продукты и которые могут играть роль регуляторных РНК молекул.

Согласно полученным данным (см пункт 3.2.2.) было показано увеличение продукции β-субъединиц АТФ-синтазы при культивировании базидиомицета на среде с

внесением CuSO_4 на уровне внутриклеточных белков. В свою очередь, транскриптомный анализ выявил, что одним из метаболических путей *T. hirsuta*, экспрессия генов которого, изменялась достаточно значимо, явилась дыхательная цепь (окислительное фосфорилирование). Причем, изменение экспрессии при внесении меди зафиксировано практически для всех компонентах этого метаболического пути (Рис. 24, табл. 12).

Межмембранное пространство митохондрий

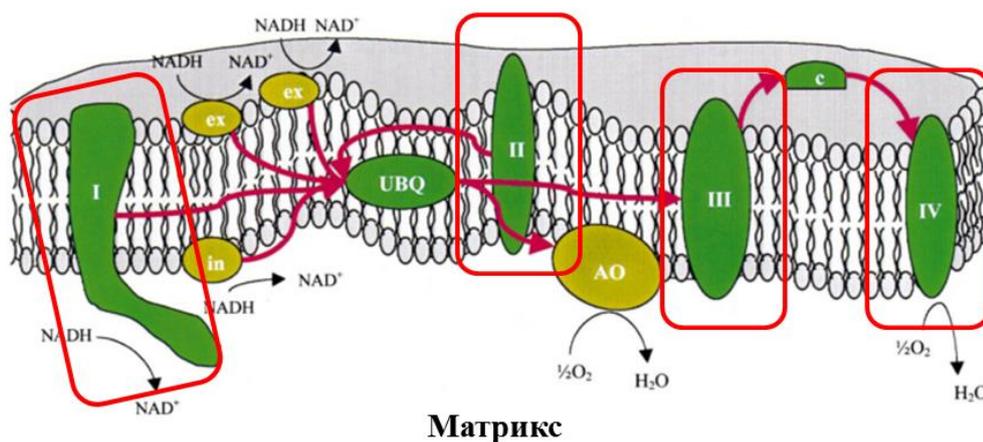


Рис. 24. Схема строения электрон-транспортной цепи митохондрий грибов [292]. Римскими цифрами обозначены Комплексы цепи I- IV; ex и in – альтернативные NADH:убихинон-оксидредуктазы; AO – альтернативная оксидаза. Выделены ферменты, изменение уровня экспрессии которых отмечено в образцах ГП и ГП/ Cu^{2+} .

Таблица 12. Изменения экспрессии генов, кодирующих ферменты окислительного фосфорилирования.

Код ЕС	Фермент	Изменение экспрессии при внесении CuSO_4	
1.6.5.3	NADH-дегидрогеназа (убихинон) «комплекс I»	↓	Снижение в 3,7 раза
1.3.5.1	Сукцинатдегидрогеназа (убихинон) «комплекс II»	↓	Уникальный для ГП среды
1.10.2.2	Убихинол-цитохром c-редуктаза «комплекс III»	↑	Увеличение в 2,5 раза
1.9.3.1	Цитохром c-оксидаза «комплекс IV»	↑	Увеличение в 14,7 раз
3.6.1.1	Неорганическая пирофосфатаза	↑	Уникальный для ГП/ Cu^{2+} среды

Из приведенных данных видно, что при внесении CuSO_4 в среду культивирования, в клетке снижается экспрессия субъединиц комплексов I и II, зато увеличивается экспрессия комплексов III и IV, а также неорганической пирофосфатазы, расщепляющей богатую энергией фосфатную связь в пирофосфате.

Снижение экспрессии комплексов I и II может быть связано с активацией альтернативного не сопряженного дыхательного пути организма, пересекающегося с канонической «сопряженной» дыхательной цепью лишь на уровне убихинона. Так, для растений и грибов показано существование ферментов, способных альтернативно окислять NADH матрикса и немитохондриального NADH, например ND_{in} и ND_{ex} , а также альтернативной цианрезистентной терминальной оксидазы AOX [292,293]. AOX растений способна непосредственно окислять пул убихинонов, однако при ее работе используется лишь его избыток, который не может быть окислен стандартной дыхательной цепью. Активность ферментов альтернативного пути не сопряжена с транслокацией протонов через мембрану и генерацией протонного потенциала. Энергия, полученная в ходе реакций рассеивается в виде тепла и не может запасаться клеткой. Имеющиеся в настоящий момент данные позволяют предположить, что альтернативный путь реализуется организмом для ускорения дыхания, что может быть использовано в различных целях: при регуляции метаболических потоков, понижения внутриклеточной концентрации кислорода, снижения продукции АФК [293].

Увеличение экспрессии пирофосфатазы так же может быть связано с изменением энергетического статуса клетки: при необходимости затратить большее количество энергии, в ходе различных метаболических процессов (например синтез ДНК и РНК, образование активированных аминокислот - молекул аминоацил-тРНК, играющих важную роль в биосинтезе белка, активация жирных кислот и глюкозы) происходит гидролиз АТФ до АМФ и пирофосфата, образующийся при этом пирофосфат может быть гидролизован с помощью растворимой пирофосфатазы. Тот факт, что в результате реакции активации соединения освобождается пирофосфат, далее гидролизуемый до неорганического ортофосфата, играет важную роль в энергетическом обеспечении направленности метаболического процесса.

Выводы к разделу 3.3.:

В ходе проведенного транскрипционного анализа были выявлены транскрипты, относительный уровень экспрессии которых значительно изменяется при индукции биосинтеза лакказы у исследуемого гриба-продуцента. Согласно анализу категорий

генной онтологии и представленности генов в образце ГП и ГП/Cu²⁺ наблюдалось выраженное изменение экспрессии генов, которые выполняют различные молекулярные функции. Крупнейшими подкатегориями для обоих образцов в библиотеке "молекулярных функций" были "каталитически активные белки" или ферменты (GO:0003824), а так же «связывающие белки» (GO:0005488), которые включали 89 и 87% всех идентифицированных транскриптов для ГП и ГП/Cu²⁺ образцов соответственно. Помимо этого, показано существование большого количества неаннотированных белков (hypothetical proteins), функция которых на данный момент неясна.

Анализ уровней экспрессии генов, кодирующих комплексы I-IV дыхательной цепи *T. hirsuta* также показал значительные изменения при внесении в среду культивирования ионов меди. Эти результаты согласуются с данными протеомного анализа, в ходе которого было показано увеличение продукции β-субъединиц АТФ-синтазы при культивировании базидиомицета на среде с внесением CuSO₄. Таким образом, были показаны изменения на уровне транскрипции, в зависимости от условий культивирования. По всей видимости, у *T. hirsuta* альтернативный путь дыхания реализуется параллельно с традиционным «цитохромным» путем и связан с активацией процессов вторичного метаболизма, в ходе которого происходит активный синтез различных соединений (белки, фенольные и другие ароматические соединения, небольшие пептиды и органические кислоты), что подтверждается повышением биосинтеза и секреции лакказы в КЖ.

3.4. Исследование мультигенного семейства лакказ *T. hirsuta*

3.4.1. *In silico* скрининг генов лакказ в транскриптоме

К началу исследования для *T. hirsuta* 072 в базах данных был известен только один ген, кодирующий лакказу LacA (NCBI №: ACC43989.1). В то же время, в ходе работы была показана продукция еще одного, отличного от LacA изофермента лакказы при культивировании базидиомицета на лигноцеллюлозном субстрате. Отсутствовали данные о количестве генов лакказ, а также об изменениях уровня транскрипции генов этих ферментов в присутствии индуктора - ионов меди.

Для базидиальных лакказ показано существование 4 консервативных медь-связывающих последовательностей: L1 (HWHGFFQ), L2 (HSHLSTQ), L3 (HPFHLHG), и L4 (HCHIDFHL) [188]. Они располагаются в 5'- и 3'-концевых участках генов лакказ. Дополнительно, с помощью множественного выравнивания последовательностей генов лакказ базидиомицетов (*Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Pleurotus ostreatus*; *Dichomitus squalens*; *Laccaria bicolor*; *Coprinopsis cinerea*; *Stereum hirsutum*), были

обнаружены еще 2 консервативных мотива: KRYRFRLV и PPTVPVLL. Используя структуру молекулы лакказы *T. hirsuta* LacA (PDB № 3FPX) было показано, что эти 2 мотива локализованы на поверхности белковой молекулы (KRYRFRLV – 194-201 ак, PPTVPVLL – 346-353 ак). Последовательность KRYRFRLV входит в структуру β -складчатого слоя одного из купредоксиновых доменов (второго домена). Тем не менее, обе последовательности не формируют активный центр фермента.

Поиск последовательностей, потенциально принадлежащих последовательностям генов лакказ, был проведен с использованием локального BLAST (алгоритм tBLASTn) на общем пуле транскриптов с запросом на поиск шести консервативных аминокислотных мотивов лакказ, выявленных при выравнивании аминокислотных последовательностей лакказ базидиомицетов: HWHG; VP(T)DQA(T)GTF(Y)WYHSHL(A)STQYC; KRYRFRLV(I)S(N); PPTVPVLL; RHPFHLGHV и HCHIDF(W)HL с учетом инвариантности некоторых аминокислотных остатков внутри блоков. Последовательность анализа показана на рис. 25.

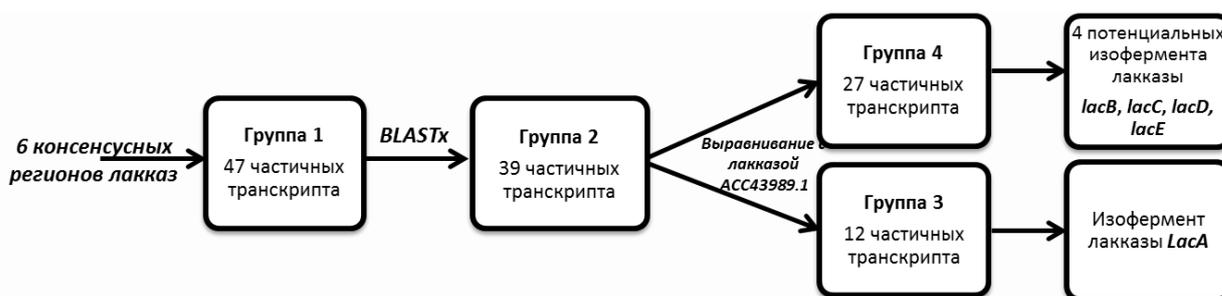


Рис. 25 . *In silico* поиск танскриптов, кодирующих лакказы в транскриптоме *Trametes hirsuta*

Первоначально, из общего пула транскриптов четырех секвенированных библиотек (SSH Cu⁺; SSH Cu⁻; MOS Cu⁺ and MOS Cu⁻) были отобраны 47 нуклеотидные последовательности, содержащие искомые мотивы, и объединены в Группу 1 (Рис. 25). Последующий их анализ с использованием алгоритма BLASTx позволил уточнить, что 39 из них, потенциально могут принадлежать генам лакказ (Группа 2), в то время как 8 последовательностей принадлежали другим белкам (цитохром P450 и оксалат декарбоксилаза) или же вовсе не кодировали белковый продукт.

Как отмечалось выше последовательность одного гена лакказы *T. hirsuta* (ACC43989.1) была известна ранее. Выравнивание последовательностей группы 2 с известной последовательностью гена лакказы *T. hirsuta*, обозначенной нами как *lacA*, позволило отобрать 12 транскриптов, которые соответствовали ей (E-value не менее 10⁻⁴) и были включены в группу 3, остальные транскрипты были включены в группу 4 и

использованы для дальнейшего анализа. Дополнительная сборка транскриптов, кодирующих лакказы (Группа 4) позволила получить 4 последовательности мРНК (помимо *lacA*), потенциально кодирующие изоферменты лакказ у *T. hirsuta*.

Таким образом, *in silico* поиск и анализ последовательностей, полученных в результате секвенирования и сборки транскриптома, позволил предсказать экспрессию не менее 5 генов лакказ базидиомицета *T. hirsuta* в исследуемых условиях культивирования. Они были обозначены как *lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD* и *lacE*, причем один из этих генов - *lacA* - соответствовал ранее забанкированной в GeneBank последовательности лакказы *T. hirsuta* (ACC43989.1). Согласно данному анализу последовательности, идентифицированные как частичные транскрипты лакказ, увеличивали свою экспрессию при внесении меди в среду культивирования (в 10-1000 раз в зависимости от последовательности).

Для получения полноразмерных нуклеотидных последовательностей мРНК лакказ была использована методика быстрой амплификации 5' и 3'-концов кДНК (RACE-ПЦР). В результате для пяти лакказ *T. hirsuta* были получены, уточнены и депонированы в базе данных GeneBank последовательности мРНК.

Дополнительный *in silico* анализ транскриптов лакказ позволил: (1) установить размеры кДНК каждого гена; (2) определить размер кодирующих областей генов лакказ; (3) рассчитать молекулярные массы (Mr), изоэлектрические точки (ИЭТ) и определить потенциальные сайты N-гликозилирования белковых последовательностей лакказ LacA, LacB, LacC, LacD and LacE *T. hirsuta* (таблица 13).

Таблица 13. *In silico* анализ полученных последовательностей кДНК и предсказанных аминокислотных последовательностей лакказ базидиомицета *T. hirsuta*.

Ген/ белок	Полно размер ная кДНК (пн)	5'НТО (пн)	3'НТО (пн)	ORF (пн)	Предсказанная аминокислотная последовательность			Сайты N- гликозили рования	Номер в GenBank
					Длина	Mr	ИЭТ		
<i>lacA</i> / LacA	1811	63	170	1563	520	55.9	5.06	8	KP027478
<i>lacB</i> / LacB	1846	65	192	1563	520	56.2	6.21	6	KP027484
<i>lacC</i> / LacC	1858	80	197	1566	521	55.6	4.40	11	KP027479
<i>lacD</i> / LacD	1837	45	205	1572	523	57.6	5.72	10	KP027480
<i>lacE</i> / LacE	1742	68	99	1560	519	58.7	6.17	6	KP027481

3.4.2. Анализ последовательностей членов мультигенного семейства лакказ *Trametes hirsuta*

Выравнивание аминокислотных последовательностей лакказ *T. hirsuta* показало, что все они содержат четыре характерные медь-связывающие мотивы, которые включают в себя консервативные остатки десяти гистидинов и одного цистеина, выступающие в качестве лигандов для медь-связывающих центров, T1 и T2/T3, и локализованные в специфических для грибных лакказ консенсусных последовательностях L1-L4 [188]. Выравнивание последовательностей показало, что для LacC, LacD and LacE характерны замены некоторых аминокислотных остатков в консенсусных последовательностях L1-L4. Так у LacC отмечены следующие замены: в L1 – 68 Phe на Ile и 79 Pro на Ala, а в L4 - 463Phe на Leu и 465Val на Ile; для LacD замены в L1 - 68Phe на Leu и 71Glu на His, в L2 - 113Ser на Ала, в L4 - 457Phe на Trp, 463Phe на Leu и 465Val на Ile; для LacE - замены: в L2 123Pro на Ala и в L3 - 397Phe на Leu (рис. 26).

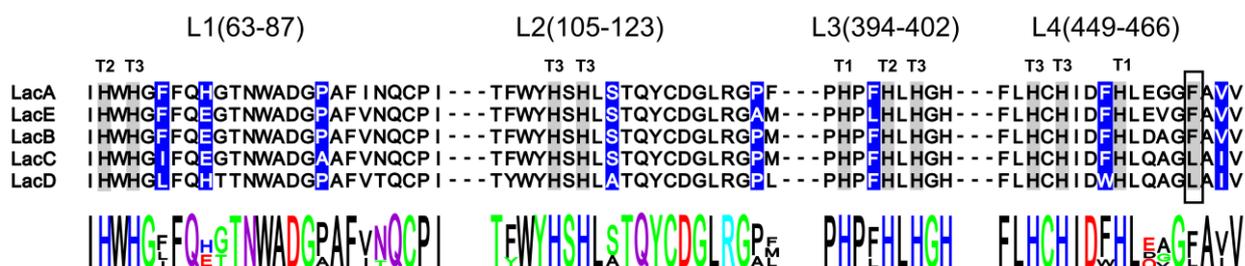


Рис. 26. Выравнивание консервативных мотивов L1-L4 лакказ *T. hirsuta*.

В зависимости от аминокислотного остатка, располагающегося на 10 аминокислот ниже консервативного цистеина, связывающего медь T3 центра в регионе L4 (рис.26), лакказы делят на три группы: содержащие метионин - M, содержащие лейцин - L и содержащие фенилаланин - F [294]. Остаток Phe в данной позиции обуславливает высокие значения редокс-потенциала T1 центра лакказ (свыше 710 мВ vs. ВЭ) согласно [190]. В нашем случае из пяти лакказ к классу 3 относятся LacA, LacB and LacE, в то время как LacC and LacD в соответствующей позиции содержат остаток лейцина, предполагая тем самым более низкие значения редокс-потенциала меди T1 для этих лакказ (500-700 мВ vs. ВЭ).

Лакказы *T. hirsuta* характеризуются вариабельностью на нуклеотидном и аминокислотном уровнях (Табл. 14), идентичность последовательностей варьировала от 58,9 до 72,1% (для нуклеотидных последовательностей) и от 59 до 76,1% (для аминокислотных остатков). Таким образом, мультигенное семейство характеризуется значительной изменчивостью.

Таблица 14. Идентичность аминокислотных и нуклеотидных последовательностей 5 лакказ *T. hirsuta*. Значения - идентичность последовательностей при попарном выравнивании, в процентах.

	LacA	LacB	LacC	LacD	LacE
LacA	***	72,1 ^{HT}	68,2 ^{HT}	63,0 ^{HT}	65,0 ^{HT}
LacB	76,1 ^{ак}	***	64,9 ^{HT}	60,9 ^{HT}	67,8 ^{HT}
LacC	70,3 ^{ак}	69,6 ^{ак}	***	61,9 ^{HT}	58,9 ^{HT}
LacD	61,2 ^{ак}	62,0 ^{ак}	62,7 ^{ак}	***	59,0 ^{HT}
LacE	68,8 ^{ак}	73,7 ^{ак}	61,1 ^{ак}	59,0 ^{ак}	***

*HT, идентичность нуклеотидных последовательностей; ак, идентичность аминокислотных последовательностей.

3.4.3. Кластеризация генов семейства лакказ *T. hirsuta* и других грибов рода *Trametes*

Транслированные аминокислотные последовательности идентифицированных лакказ *T. hirsuta*, сравнивали с последовательностями лакказ из других грибов рода *Trametes*, существующих в базах данных. При этом использовали последовательности, чья идентичность лакказам LacA-LacE составляла не менее 70%. Как показал анализ, LacA *T. hirsuta* по аминокислотной последовательности была наиболее близка лакказа из *Trametes maxima* (PDB: 3DIV) и *T. versicolor* (PDB: 1KYA) с идентичностью последовательностей 95 и 89% соответственно. Лакказы *T. hirsuta* LacB, LacC, LacD и LacE имели максимальную степень идентичности с лакказами *T. versicolor* (PDB: 1GYC) – 86%; *Trametes* sp. AH28-2 Лакказа В (AAW31597) – 80%; *T. versicolor* FP-101664 SS1 Lac7 (EIW58136) – 77% и лакказой *Trametes* sp. I-62 (AAQ12268) - 76% соответственно.

Все выбранные аминокислотные последовательности лакказ использовали для филогенетического анализа. Филогенетическое дерево было построено с помощью метода максимального правдоподобия, в качестве внешней группы использовали последовательность лакказы аскомицета *Aspergillus niger* ATCC (EHA19536.1).

Таким образом, согласно филогенетическому анализу гетерогенность внутри лакказного семейства гриба *T. hirsuta* была выше, чем гетерогенность между ними и лакказами других представителей рода *Trametes*. Аналогичные данные были получены ранее для изоферментов лакказ других базидиомицетов [80,295,296]. Данный анализ позволил выделить 4 больших кластера среди лакказ рода *Trametes* (Рис. 27): клада 1 А (LacA); клада 2 (LacB); клада 3 (LacC); клада 4 (LacD). Лакказа LacE не входила ни в один из этих кластеров.

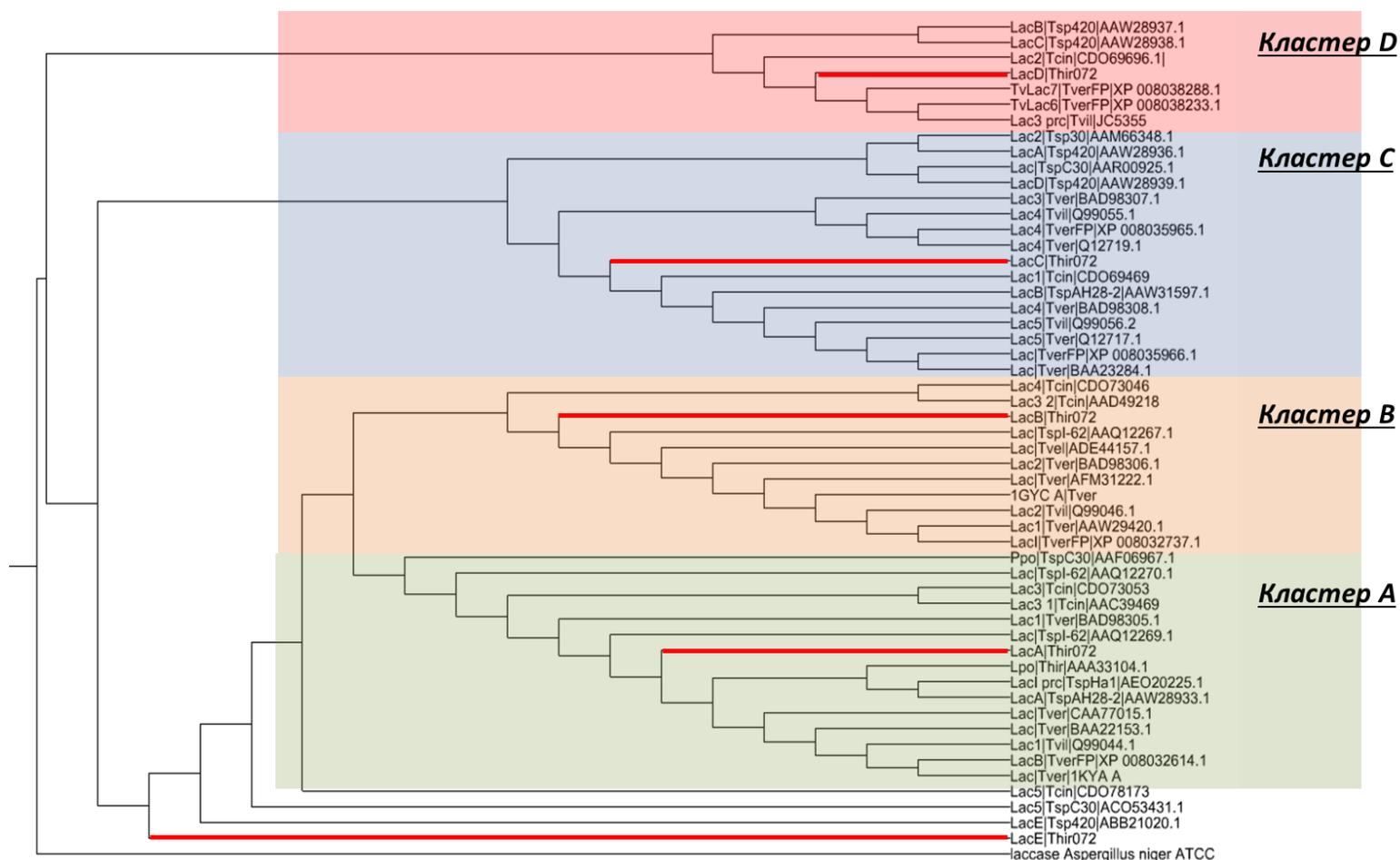


Рис. 27. Кластеризация а/к последовательностей лакказ грибов рода *Trametes*. Краткие обозначения видов: Tsp420, *Trametes* sp. 420; Thir072, *T. hirsuta* 072, TverFP, *T. versicolor* FP-101664 SS1; Tvil, *T. villosa*; TspC30, *Trametes* sp. C30; Tver, *T. versicolor*; TspAH28-2, *Trametes* sp. AH28-2; Tspi-62, *Trametes* sp. I-62; Tvel, *Trametes velutina*; TspHa1, *Trametes* sp. Ha1; Tcin, *Trametes cinnabarina*. *Aspergillus niger* ATCC – внешняя группа. Указаны номера белков в базах данных NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) или PDB (<http://www.rcsb.org/>).

Таблица 15. Характеристики лакказ грибов рода *Trametes*.

Лакказы <i>Trametes</i>	# в базе данных NCBI (PDB)	Mr (кДа)	ИЭТ	K_m (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	N_{opt}	Потенциальные сайты N-гликозилирования/ Содержание углеводов (%)	Ссылки
Кластер А								
<i>T. versicolor</i> Лакказа Шб (LacШb)	1KYA	60	3,23, 3,11, 3,0, 2,88, 2,75	60	220	3,0-4,0	6/ н/д	[297,298]
<i>T. villosa</i> Лакказа-1 (LAC1)	Q99044.1	65	3,5	н/д	н/д	2,7	6/10	[299]
<i>T. versicolor</i> Лакказа Ш	BAA22153.1	66	3,5	н/д	н/д	н/д	6/10	[300]
<i>T. versicolor</i> Lccβ	CAA77015.1	64,4	3,07-3,27	88	203	2,3	5/10-14	[158,192]
<i>Trametes</i> sp. Ha1 Лакказа I (Lac I)	AEO20225.1	62	3,0	н/д	н/д	н/д	7/ н/д	[191]
<i>Trametes</i> sp. AH28-2 Лакказа A (LacA)	AAW28933.1	62	4,2	25	692	н/д	8/11-12	[301]
<i>T. hirsuta</i> Лакказа	AAA33104.1	63	н/д	н/д	н/д	н/д	7/15	[302]
<i>T. hirsuta</i> 072 Лакказа A (LacA)	KP027478	66	4,0	19	964	3,0	8/12	В этой работе, [303]
<i>Trametes</i> sp. C30 LAC1	AAF06967.1	62-63	2,0-3,6	10,7	56	н/д	5/12	[304,305]
<i>T. versicolor</i> шт. UAMH 8272 Лакказа 1 (Lac1)	BAD98305.1	н/д	3,5–4,0	н/д	н/д	н/д	4/ н/д	[306]
<i>T. cinnabarina</i> шт. ATCC 200478 Лакказа LCC3-1	AAC39469.1	76.5	3,7	н/д	н/д	н/д	7/9	[294,307]
<i>T. cinnabarina</i> шт. I-937 Лакказа 1 (LacI)	AAF13052.1 (2XYB)	70	3,4-3,8	55	н/д	2,5	5/10	[308,309]

Кластер В

<i>T. versicolor</i> Lccα	AAW29420.1	64,4	4,64-6,76	12-22	55	1,9	8/ н/д	[158,192,199]
<i>T. villosa</i> Лакказа-2 (LAC2)	Q99046.1	66	5,0, 6,0, 6,2, 6,5, 6,8	н/д	н/д	2,7	6/ н/д	[299]
<i>T. versicolor</i> Лакказа (LccA)	AFM31222.1	58	н/д	н/д	н/д	2,0	8/~10	[310]
<i>T. cinnabarina</i> шт. ATCC 200478 Лакказа LCC3-2	AAD49218.1	н/д	5,4	н/д	н/д	н/д	8/ н/д	[311]
<i>T. hirsuta</i> LacB	AIZ72727.1	56,2	6,21	н/д	н/д	н/д	6/ н/д	В этой работе

Кластер С

<i>T. versicolor</i> Lccγ	BAA23284.1	н/д	н/д	359	647	3,1	12/ н/д	[158,192]
<i>T. versicolor</i> rLaccase-5 (rLac5)	Q12717.1	85	н/д	н/д	н/д	5,5	13/~25	[312]
<i>Trametes sp.</i> шт. АН28-2 Laccase B (LacB)	AAW31597.1	74	4,0	177	2277	4,7	11/25	[313]
<i>T. versicolor</i> шт. УАМН 8272 Лакказа4 (Lac4)	BAD98308.1	н/д	3,6	н/д	н/д	н/д	13/ н/д	[306]
<i>Trametes sp.</i> C30 LAC3	AAR00925.1	~77-80	н/д	280	944	5,7	9/ н/д	[206]
<i>Trametes sp.</i> 420 rLaccase D (LacD)	AAW28939.1	77	н/д	427	н/д	н/д	6/~30	[314]
<i>T. versicolor</i> Lccδ	CAA59161.1	н/д	н/д	2262	798	3,1	6/ н/д	[158,192]
<i>Trametes sp.</i> C30 LAC2	AAM66349.1	65	3,2	536	683	5,7	11/ н/д	[205]
<i>T. hirsuta</i> LacC	AIZ72722.1	55.6	4.40	н/д	н/д	н/д	11/ н/д	В этой работе

Кластер D

<i>T. villosa</i> Лакказа-3 LAC3	JC5355	63	6,2, 6,5, 6,8	н/д	н/д	6,0	9/ н/д	[295]
<i>T. hirsuta</i> LacD	AIZ72723.1	57.6	5.72	н/д	н/д	н/д	10/ н/д	В этой работе

Неразрешенные позиции

<i>Trametes sp.</i> 420 Laccase E (LacE)	ABB21020.1	62,8	4,6	35	406	2,7	4/14	[207]
<i>T. hirsuta</i> LacE	AIZ72724.1	58.7	6.17	н/д	н/д	н/д	6/ н/д	В этой работе

Кластеризация согласно филогенетическому анализу. Выделены серым изоферменты лакказ *T. hirsuta*, для них указаны расчетные Mr и ИЭТ. Каталитические свойства представлены для субстрата ABTS. н/д – нет данных.

При анализе существующих данных о физико-химических и каталитических свойствах лакказ рода *Trametes* (Табл. 15) оказалось, что лакказы, входящие в отдельные клады филогенетического дерева обладают разными свойствами. На настоящий момент наиболее изученными и подробно описанными являются лакказы кластера А. Для них характерны молекулярная масса 60-70 кДа (за исключением LCC3-1), содержание углеводов - 10-15% и от 4 до 8 потенциальных сайтов N-гликозилирования. Они также характеризуются продукцией большого количества изоформ с ИЭТ в диапазоне рН 2,0 – 4,0. Значения рН оптимумов (при окислении субстрата АВТС) для лакказ этого кластера лежат в кислой области, а константы Михаэлиса (K_m) – в пределах 11-88 μM для данного субстрата.

Лакказы, входящие в кластер В, имеют схожую молекулярную массу (58-66 кДа), содержание углеводов (около 10%), количество потенциальных сайтов N-гликозилирования (6-8) и продукцию множественных изоформ. Но в отличие от кластера А, значения их ИЭТ сдвинуты в более щелочную область рН (4,5-7,0). Причем, если значения оптимумов рН для окисления АВТС у лакказ кластера В были близки к значениям таковых для лакказ кластера А (1,9-2,7), то значения констант Михаэлиса были ниже (12-20 μM).

Для лакказ кластера С характерны более высокие молекулярные массы (65-85 кДа), по сравнению с лакказами кластеров А и В, и большее число сайтов гликозилирования (6-13), а так же большее содержание углеводов (25-30%). Для этих лакказ не была показана продукция изоформ в среде культивирования. Характерными значениями ИЭТ для них были значения рН 3,2-4,0. Так же отмечено более высокое сродство лакказ кластера С к субстрату АВТС (K_m 177-536 μM , за исключением Lcc δ). Оптимум рН при окислении АВТС увеличивается до значения 5,7, по сравнению с лакказами кластеров А и В.

Несмотря на то, что при филогенетическом анализе хорошо виден отдельно сформированный кластер D лакказ грибов рода *Trametes*, лишь одна лакказа, относящаяся к этому кластеру, на настоящий момент частично охарактеризована. Показано, что она представлена несколькими изоформами со значениями ИЭТ в нейтральном диапазоне рН (6,2-6,8), а рН оптимум при окислении АВТС сдвинут в более щелочной регион по сравнению с лакказами других кластеров – 6,0.

Лакказа Е гриба *Trametes* sp. 420 (АВВ21020.1) располагается на неразрешенной ветви филогенетического дерева, так же как и LacE *T. hirsuta*. По своим физико-химическим и каталитическим свойствам эта лакказа *Trametes* sp. 420 близка к ферментам кластера А.

Известно, что лакказы кластера А являются мажорными изоферментами, с конститутивной продукцией. При анализе лакказ гриба *Trametes* sp. AN28-2 было показано, что экспрессия LacA (кластер А, AAW28933.1) индуцировалась в присутствии всех исследуемых ароматических соединений, максимальная индукция для LacB (кластер В, AAW31597.1) была отмечена в присутствии 3,5-дигидрокситолуола, в то время как LacC (кластер С, AAW28934.1) вообще не индуцировалась исследуемыми соединениями, зато активно экспрессировалась при кокультивировании с аскомицетом *Trichoderma* sp. ZH1 [204]. Дифференциальная экспрессия генов, кодирующих изоферменты лакказ в присутствии разных индукторов, была показана так же для грибов *Trametes* sp. 420 [314], *Trametes* sp. I-62 [208], *T. versicolor* [315], *Trametes* sp. Ha1 [191] и *T. cinnabarina* [311].

Повышенное гликозилирование лакказ кластера С может быть связано с защитой от действия протеолитических ферментов. Так, было показано, что N-связанные гликозидные цепи лакказ играют важную роль в защите фермента от деградации под действием протеаз [316]. Основываясь на данных таблицы 15 можно предположить, что на стадиях деградации лигнина, сопровождающихся повышенной продукцией протеолитических ферментов [317,318], наиболее активно должны продуцироваться именно лакказы кластера С, содержащие до 30% углеводов.

По литературным данным лакказы, относящиеся к различным кластерам обладают и различной субстратной специфичностью. Так, например, Lac4 базидиомицета *T. versicolor* UAMH 8272 (BAD98308.1), относящаяся к кластеру С, более активна по отношению к полихлорированным бифенилам, чем Lac1 (BAD98305.1), относящаяся к кластеру А [306]. Субстратная специфичность и каталитические свойства достаточно подробно изучены на лакказах базидиомицета *T. versicolor* [158,192,315]. Изоферменты Lacβ и Lacα, относящиеся к кластерам А и В, способны эффективно окислять полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), причем Lacα более активно, чем Lacβ. Изофермент Lacγ, относящийся к кластеру С окисляет только аценафтен, причем с достаточно низкой активностью, а Lacδ (так же кластер С) вообще не способен окислять ПАУ, хотя был наиболее эффективен при окислении синаповой кислоты [158].

Проведенный анализ подтверждает предположение о том, что, лакказы, составляющие мультигенные семейства грибов рода *Trametes* и относящиеся к различным кластерам, способны выполнять разные функции в грибах, чем и объясняется их различная субстратная специфичность, а также регуляция экспрессии.

3.4.4. Изучение динамики экспрессии индивидуальных лакказ при культивировании на средах различного состава

К предполагаемым функциям, выполняемым лакказами микроорганизмов относят: участие в деградации лигнина, детоксификации, продукции пигментов, образовании плодовых тел, вегетативном росте и проч. Филогенетические исследования лакказ аскомицетов и базидиомицетов показали, что все ферменты распределяются по нескольким кластерам, причем внутри этих кластеров лакказы достаточно сильно различались по физико-химическим свойствам. В связи с этим была выдвинута гипотеза, что лакказы из разных кластеров играют различную роль в жизнедеятельности и развитии гриба [158,319]. Однако специфические функции отдельных изоферментов лакказ установлены не были, хотя для некоторых из них доказано прямое участие в процессах деградации лигнина [178,307].

Судя по всему, продукция изоферментов у различных грибов, в том числе рода *Trametes* изменяется во времени и зависит от стадии деградации лигнина [299]. Так, например, в процессе роста *Phlebia radiata* на хвойных и деревьях твердых пород основной изофермент Lac1 (транскрипт *Pr-lac1*) появлялся на 5-й день культивирования, а на 13-й день культивирования продуцировался уже фермент Lac2 (транскрипт *Pr-lac2*). Интересно, что молекулярные массы и pI Lac1 и Lac2, составили 63 и 58 кДа, и 3,2-3,5 и 5,8 соответственно [200]. Лакказы, относящиеся к другим кластерам активно продуцировались после накопления в среде продуктов деградации лигнинов.

Для определения индивидуальных особенностей транскрипционной активности изоферментов лакказ *T. hirsuta* в процессах жизнедеятельности гриба с помощью qPCR нами была изучена динамика экспрессии каждого из пяти генов лакказ *T. hirsuta* (*lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD* и *lacE*) при культивировании базидиомицета в различных условиях (ГП, ГП/Cu²⁺, ГП/AL).

На рис. 28 представлены относительные количества каждого транскрипта при культивировании в течение 10 дней (пробы отобраны с 12-часовым интервалом), нормализованные по отношению к тубулину - гену внутреннего контроля, выбранного для всех экспериментов [226].

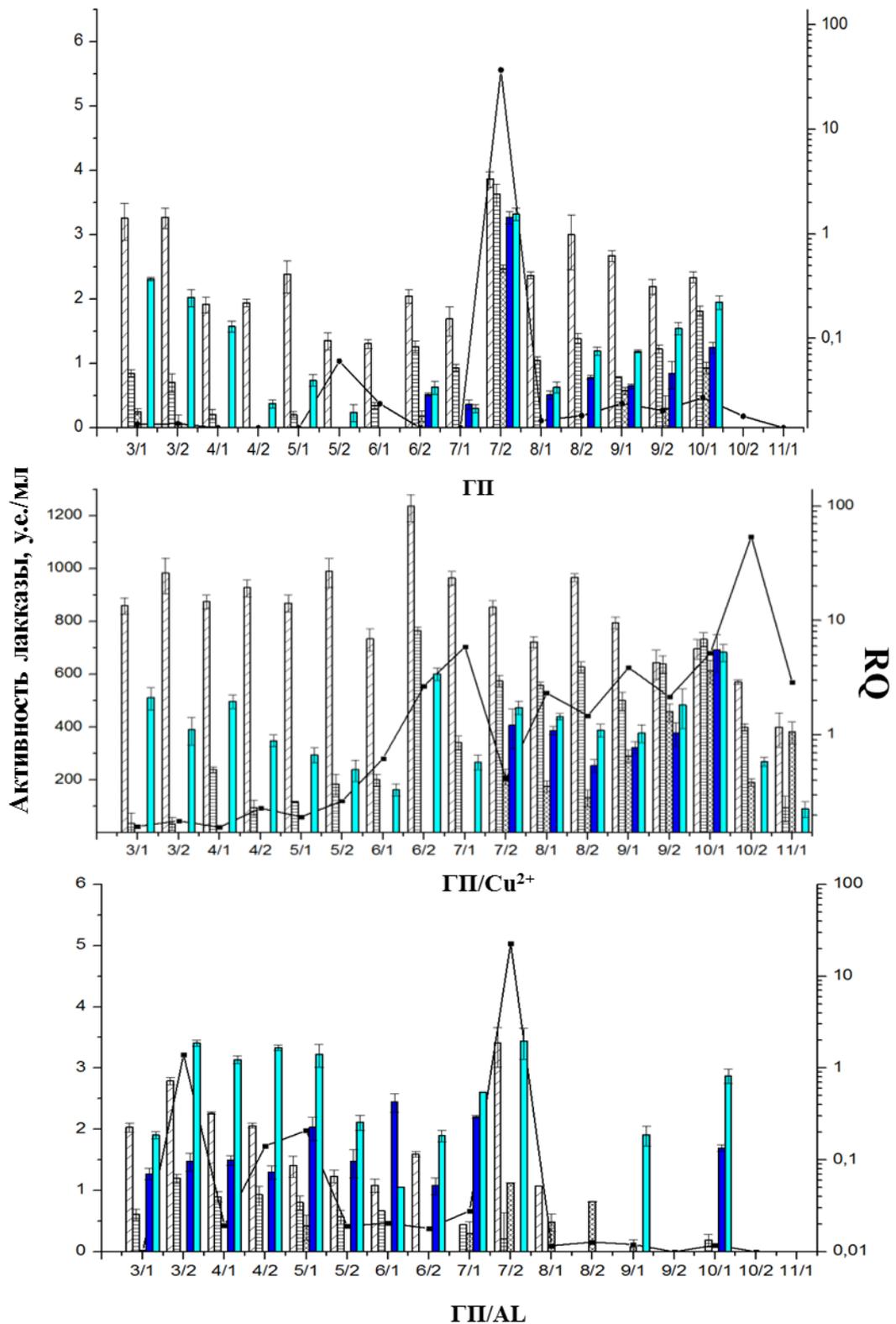


Рис. 28. Динамика экспрессии генов лакказ *T. hirsuta* при культивировании на средах различного состава. Образцы отбирали каждые 12 часов в течение 10 суток культивирования, начиная с 3 суток. Условные обозначения генов лакказ:

- *lacA*
 - *lacC*
 - *lacD*
 - *lacE*
 - *lacB*

Основной пик активности лакказы в КЖ приходился на 6-7 сутки культивирования независимо от среды. В большинстве случаев (ГП и ГП/Cu²⁺ среды) вплоть до фазы стационарного роста экспрессировались гены *lacA*, *lacB* и *lacC*, после чего наблюдалась экспрессия всех 5 генов. Однако при внесении эффекторов профиль их экспрессии изменялся в зависимости от конкретного вещества.

Уровень транскрипции *lacA* является наибольшим среди всех генов, кодирующих лакказы *T. hirsuta* для всех сред, кроме среды с внесением растворимого лигнина. Он являлся основным изоферментом, экспрессия которого была отмечена на всех исследуемых средах. В большинстве случаев, уровень экспрессии остальных анализируемых генов лакказ был ниже и в значительной степени зависел от состава среды и времени культивирования базидиомицета. В то же время при культивировании на среде ГП/AL наибольший уровень экспрессии был отмечен для гена *lacB*, в то время как экспрессия *lacA* была минимальна (на уровне или ниже контроля). Более того, транскрипция генов *lacE* и *lacD*, начиналась гораздо раньше (на 3-и сутки), а сама кривая накопления биомассы носила более «растянутый» во времени характер - отсутствовала четко выраженная фаза экспоненциального роста. Стоит так же отметить, что активность лакказы в случае внесения лигнина в среду была низкой – на уровне контроля, однако появлялся дополнительный пик на третьи сутки культивирования.

3.4.5. Влияние эффекторов на профили экспрессии генов лакказ *T. hirsuta*

Наличие в промоторной области большинства изученных генов лакказ регуляторных элементов различных групп является косвенным доказательством общности механизмов индукции биосинтеза лакказ у базидиомицетов, относящихся к грибам белой гнили. В то же время состав и количество *cis*-элементов достаточно сильно варьирует в зависимости от конкретного гена, подразумевая специфичность регуляции транскрипции в зависимости от «состава» промоторного региона. Существующие данные позволяют предположить, что в случае лакказ, члены мультигенного семейства выполняют различные функции, чем и определяется обширность этого семейства.

Известно, что экспрессию и продукцию лакказ регулируют различные индукторы, такие как ионы металлов, различные ароматические соединения, структурно близкие лигнину или его производным, синтетические красители и ксенобиотики. Тем не менее, для двухвалентных ионов меди показана «универсальность» индукции биосинтеза лакказ

у различных базидиомицетов, как по уровню активности в среде ферментации, так и на уровне транскрипции [71,72].

Внесение CuSO₄

Нами была исследована динамика экспрессии каждого из 5 генов лакказ *T. hirsuta* при внесении ионов меди Cu²⁺ в среду культивирования (Рис. 29). Индукция экспрессии показана для всех генов, однако уровень этой индукции и ее характер были различны у членов мультигенного семейства. На начальных этапах культивирования (1-3 сутки, лаг-фаза) значительной индукции транскрипции лакказ отмечено не было. Наибольший рост транскрипции наблюдался для генов *lacA* (в 9-18 раз) и *lacB* (в 4,5 – 5,7 раз). Остальные гены транскрибировались на уровне близком к уровню контроля. При переходе в фазу экспоненциального роста гриба (4-7 сутки) отмечено значительное влияние ионов меди на гены *lacA* (увеличение экспрессии в 34-391 раз), *lacB* (14,9-100 раз) и *lacC* (13,7-97 раз). Далее, в стационарной фазе роста влияние ионов меди наблюдалось для всех лакказ, причем транскрипт *lacA* уже не являлся преобладающим, а увеличение экспрессии генов происходило в одном диапазоне значений: *lacA* - 13,6 – 24 раз, *lacB* 13,8-42 раза, *lacC* 37-52,5 раз, *lacD* 20,7-74 раз, *lacE* 12,7 - 67раз. Экспрессия *lacD* начинается в основном на самых поздних этапах культивирования (после 8х суток). Стоит так же отметить, что для *lacB* и *lacC* характерна стабильная реакция на внесение индуктора, в то время как экспрессия остальных генов варьировала в широких пределах.

Предполагается, что металлочувствительные системы транскрипции генов играют важную роль в метаболизме металлов и процессах детоксификации [95]. Так на примере металлотионеинов было показано, что именно с их помощью в цитозоле клетки поддерживается необходимая концентрация ионов меди (а так же некоторых других металлов), и регуляция синтеза этих белков происходит, аналогично регуляции лакказ, на транскрипционном уровне с помощью специфических металлозависимых *cis*-элементов. Таким образом, логично предположить, что лакказы *T. hirsuta* (все или отдельные гены) вовлечены в процесс детоксификации клетки и метаболизма токсичных металлов.

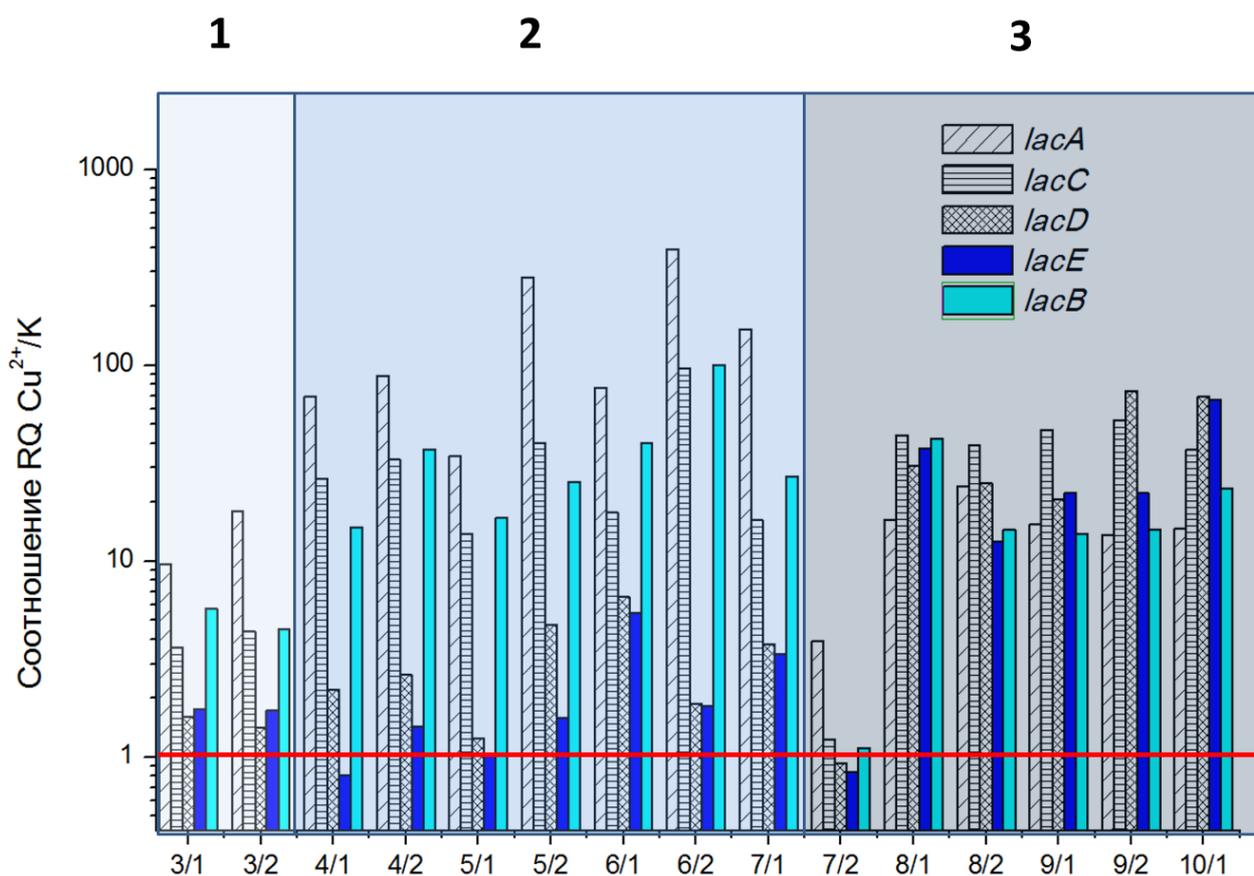


Рис. 29. Соотношение экспрессии лакказ *T. hirsuta* при их индукции ионами меди Cu^{2+} (lg шкала). Цифрами обозначены фазы роста базидиомицета: 1 – лаг-фаза, 2 – экспоненциальный рост, 3 – стационарная фаза роста. Красная линия – уровень экспрессии гена по отношению к контролю остается неизменным.

Внесение водорастворимого лигнина

Лигнин является сложным биополимером растительного происхождения полифенольной природы, состав которого изменяется в зависимости от источника. В лиственных породах деревьев – характерных для обитания *T. hirsuta*, он состоит в основном из мономеров двух типов: гваяцильных (G-субъединицы) и сирингильных (S-субъединицы), доля которых составляет около 65%. В работе был использован водорастворимый лигнин, условная структура которого представлена на рис. 30.

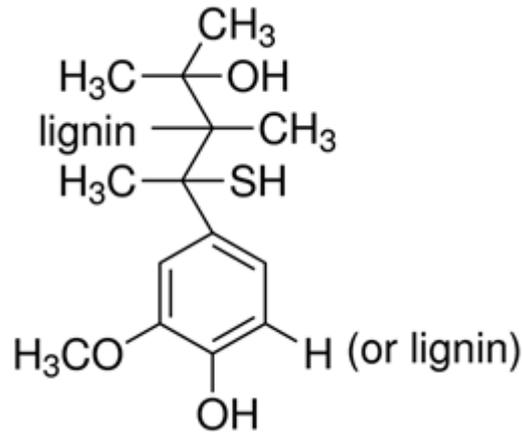


Рис. 30. Структура используемого в работе лигнина [<http://www.sigmaaldrich.com>]

В случае со средой ГП/AL наиболее примечательным является тот факт, что экспрессия гена, кодирующего мажорный изофермент *lacA*, а так же *lacC* была подавлена (или находилась на уровне контроля) в течение всего периода культивирования, зато уже на ранних этапах культивирования наблюдалась значительная индукция экспрессии *lacE* и *lacB* (в 65 и 70 раз соответственно) (Рис. 31).

Можно предположить, что транскрипция этих генов положительно регулируется соединениями фенольной природы (вероятно мономерными единицами лигнина). Стоит так же отметить характерную черту строения структурных единиц используемого лигнина: расположение заместителей в молекулах, специфическое для сирингилпропановых единиц лигнина (Рис. 32).

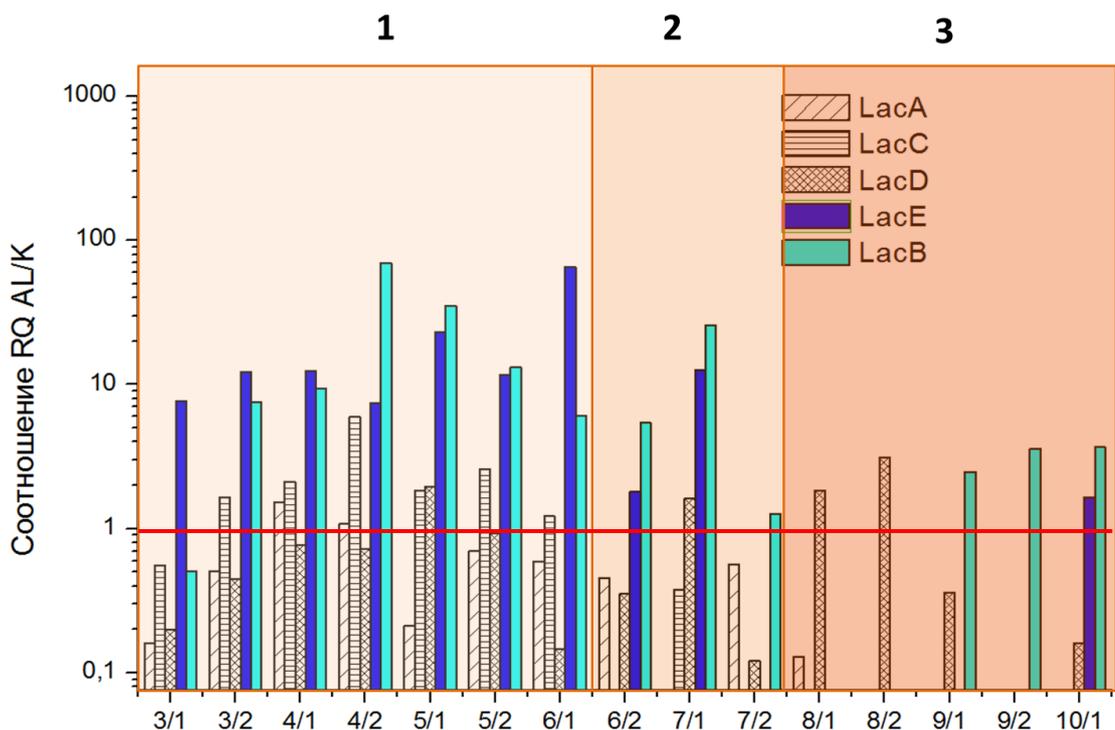


Рис. 31. Соотношение экспрессии лакказ *T. hirsuta* при их индукции водорастворимым лигнином (log шкала). Цифрами обозначены фазы роста базидиомицета: 1 – лаг-фаза, 2 – экспоненциальный рост, 3 – стационарная фаза роста. Красная линия – уровень экспрессии гена по отношению к контролю остается неизменным.

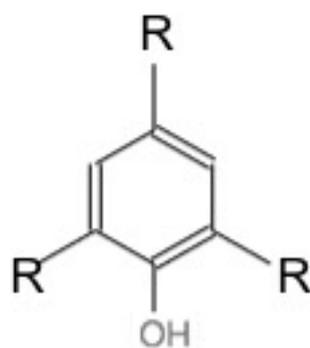


Рис. 32. Характерное расположение заместителей в сирингилпропановых единиц лигнина.

По-видимому, для регуляции транскрипции *lacE* и *lacB*, важна специфическая структура индуктора, а так же, в меньшей степени, характер заместителей. В ходе каталитического цикла лакказы окисляют фенольные мономеры лигнина до феноксильных радикалов, которые вступают в неферментативные реакции деметоксилирования лигнина и метоксифенольных кислот, а также реакции образования хинонов или олигомерных продуктов окисления [320]. Таким образом, регуляция экспрессии может быть связана с количеством и характером свободных мономеров с определенной структурой молекулы в среде.

Выводы к разделу 3.4.:

Нами было получено 5 полноразмерных последовательностей кДНК (мРНК), входящих в мультигенное семейство лакказ *T. hirsuta*. Все они включали специфические медь-связывающие мотивы L1-L4, характерные для лакказ, а так же по 2 дополнительных мотива, ранее не описанных для базидиальных лакказ, но являющихся высококонсервативными для всех белков этого семейства у грибов различных групп. Показано, что лакказы, входящие в мультигенное семейство *T. hirsuta* характеризуются значительной изменчивостью последовательностей (идентичность варьировала от 58,9 до 72,1% - для нуклеотидных последовательностей и от 59 до 76,1% - для аминокислотных остатков). С помощью методов биоинформатического анализа предсказаны физико-химические свойства идентифицированных белков (ИЭТ, Mr, количество сайтов гликозилирования).

Впервые изучена динамика экспрессии генов лакказ при культивировании *T. hirsuta* в различных условиях. При этом показана дифференциальная экспрессия генов в зависимости от условий и времени культивирования гриба (Рис. 33). Стоит отметить, что ионы меди оказались универсальным индуктором для всех генов лакказ семейства – увеличение экспрессии наблюдалось практически во всех случаях (кроме *lacD* и *lacE* в экспоненциальной фазе роста), однако не для всех генов индукция медью была максимальной.

Наиболее представленным геном, экспрессия которого отмечена на всех средах, был *lacA*. Однако она подавлялась присутствием в среде водорастворимого лигнина, особенно в фазе стационарного роста базидиомицета.

Среда	Транскрипционный ответ			
	ГП/Cu ²⁺		ГП/AL	
Фаза роста	2	3	2	3
<i>lacA</i>	↑	↑	↔	↓
<i>lacB</i>	↑	↑	↑	↑
<i>lacC</i>	↑	↑	↓	↓
<i>lacD</i>	↔	↑	↔	↔
<i>lacE</i>	↔	↑	↑	↑

Рис. 33. Влияние различных условий культивирования на транскрипцию генов лакказ по сравнению с контрольной средой. Условные обозначения:

↑ - Уровень транскрипции увеличивался; ↔ - Уровень транскрипции не изменялся; ↓ - Уровень транскрипции понижался.

Ионы меди так же положительно регулировали экспрессию *lacB*, *lacC*, а так же *lacE* и *lacD*, но лишь в стационарной фазе роста, где наблюдался активный лизис культуры.

При внесении в среду культивирования растворимого лигнина подавлялась экспрессия генов, кодирующих изоферменты *lacC* и на поздних этапах роста базидиомицета - *lacA*. Ген *lacD* не изменял экспрессию по сравнению с контролем, зато заметно увеличивали экспрессию *lacB* и *lacE* (до 70 раз). По-видимому, именно эти гены лакказ *T. hirsuta* наиболее чувствительны к соединениям фенольной природы и/или продуктам деградации лигнина.

Различия в профилях экспрессии и предсказанных биохимических свойствах пяти изоферментов лакказ подтверждают гипотезу о различном механизме регуляции их экспрессии и позволяют предположить существенные изменения в физиологической роли, которую они играют на разных стадиях развития гриба.

Сравнение данных протеома и секретома при культивировании *T. hirsuta* на лигноцеллюлозном субстрате (овсяной соломе) с транскрипционным анализом при росте в присутствии водорастворимого лигнина показало наличие белковых продуктов генов *lacA* и *lacC* – изоформ LacA и LacC, хотя уровень экспрессии этих генов был достаточно низким. Однако, согласно предположению о полифункциональности членов мультигенных семейств, не все лакказы могут секретироваться организмом во внешнее окружение и тем более, сохраняться в активном состоянии в КЖ, не деградируя при этом под действием внеклеточных протеаз, в достаточных количествах идентифицированных

среди секретируемых белков *T. hirsuta*.. Следует отметить, что при всех условиях культивирования, белковые продукты всех генов семейства лакказ *T. hirsuta* в протеоме используемыми методами обнаружены не были.

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что процессинг лакказ является сложным механизмом, регуляция которого происходит главным образом на уровне посттрансляционных модификаций, а не на уровне транскрипции и секреции. При этом различия в предсказанных биохимических свойствах изоферментов, их представленности в секретоме и профилях экспрессии генов, кодирующих лакказы *T. hirsuta*, подтверждают гипотезу о полифункциональности данного семейства ферментов: а именно различные изоферменты играют различные физиологическую роль в жизненном цикле гриба.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований в соответствии с поставленной целью диссертационной работы реализовано комплексное изучение организации мультигенного семейства лакказ *Trametes hirsuta*, включающее в себя характеристику его членов на уровне продукции внеклеточных и внутриклеточных белков, а так же на уровне транскриптома. На основании проведенной работы были сформулированы следующие выводы:

1. Показано, что основным компонентом лигнолитического комплекса *T. hirsuta* являются лакказы, чья активность отмечена на всех средах, вне зависимости от их состава и времени культивирования гриба. При этом в секретах были обнаружены 2 изофермента (LacA и LacC) и их множественные изоформы. Установлено, что ферменты, секретируемые *T. hirsuta*, проявляют в основном глюконазную и маннозидазную активности. Впервые показана секреция базидиомицетом церато-платанинов - низкомолекулярных белков с экспансин-подобной активностью, способные разрушать нековалентные связи в полисахаридах клеточной стенки в ответ на внесение в среду культивирования лигноцеллюлозы.
2. Сравнительный анализ протеома *T. hirsuta* в присутствии индуктора – ионов меди, и без него показал наличие пула белков, продукция которых увеличивалась в присутствии индуктора. Из них было идентифицировано 4 белка: 2 изоформы β -субъединицы АТФ-синтазы, белки группы молекулярных шаперонов Hsp70, участвующие в частности в синтезе и фолдинге белков, и активатор шаперонов St1.
3. Установлено, что основное влияние на транскрипционном уровне ионы меди оказывают на процессы метаболизма углеводов (ЦТК, гликолиз/глюконеогенез, пентозо-фосфатный путь, глиоксилатный цикл), метаболизма пуриновых и пиримидиновых оснований, а также на экспрессию генов, кодирующих ферменты, участвующие в процессе дыхания.
4. Установлено, что мультигенное семейство лакказ базидиомицета *T. hirsuta* состоит минимум из 5 генов, полноразмерные последовательности которых определены и забанкированы (GeneBank №: *lacA* - KP027478; *lacB* - KP027484; *lacC* - KP027479; *lacD*- KP027480; *lacE* - KP027481). Сравнение аминокислотных последовательностей идентифицированных лакказ и других лакказ грибов рода *Trametes* показало их

разделение на клады, предположительно обладающие различными функциональными свойствами.

5. Показана дифференциальная экспрессия идентифицированных генов лакказ в зависимости от условий и времени культивирования *T. hirsuta*. По данным транскрипционного анализа, ионы меди повышают экспрессию всех генов лакказ: *lacA* (увеличение экспрессии в 34-391 раз), *lacB* (в 14,9-100 раз), *lacC* (13,7-97 раз), *lacD* (20,7-74 раз) и *lacE* (12,7 – 67 раз). Водорастворимый лигнин оказывал как индуцирующее действие на гены *lacB* и *lacE* (индукция до 70 раз), так и ингибирующее действие на экспрессию *lacA* (снижение экспрессии до 100 раз) и *lacC* (снижение до 20 раз) по сравнению с экспрессией на контрольной среде.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Vasina D.V., Mustafaev O.N., Moiseenko K.V., Sadovskaya N.S., Glazunova O.A., Tyurin A.A., Fedorova T.V., Pavlov A.R., Tyazhelova T.V., Goldenkova-Pavlova I.V., Koroleva O.V. The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction. *Biochimie*. 2015, v. 116, p. 154–164.
2. Loginov D.S., Vavilova E.A., Savinova O.S., Abyanova A.R., Vasina D.V., Zherdev A.V., Koroleva O.V. Immunoassays of fungal laccases for screening of natural enzymes and control of recombinant enzyme production. *Biotechnology and Applied Biochemistry, Biotechnol Appl Biochem*. 2014. V. 61(2), p. 230-236.
3. Васина Д.В., Логинов Д.С., Королева О.В. Сравнительный анализ протеома базидиального гриба *Trametes hirsuta* при культивировании на средах различного состава. *Биохимия*, 2013; 78(5), с. 477-84.
4. Васина Д.В., Логинов Д.С., Мустафаев О.Н., Голденкова-Павлова И.В., Королева О.В.. Спектр генов-кандидатов, вовлеченных в биосинтез лакказы гриба *Trametes hirsuta*. *Генетика*, 2013, Т. 49, Выпуск 10, с. 1149–1154.

Материалы конференций:

5. Сравнительный анализ протеома и секретомабазидиального гриба *Trametes hirsuta* при росте на средах разного состава. Васина Д.В., Федорова Т.В., Королева О.В.; Сборник тезисов докладов V Российского симпозиума "Белки и пептиды", Петрозаводск, 2011, p.271
6. Proteomic analysis of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* grown on different substrates. Vasina D.V., Fedorova T.V., Koroleva O.V.; IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroworld2011, Torremolinos (Spain), 2011, p.523
7. Анализ мультиферментного комплекса лигнолитического действия, синтезируемого базидиальным грибом *Trametes hirsuta* при росте на лигноцеллюлозном субстрате. Васина Д.В., Федорова Т.В., Королева О.В.; Материалы международной школы-конференции молодых ученых, посвященной 80-летию Брянской государственной инженерно-технологической академии и профессору В.П.Тимофееву, 2011, стр.75-77.

8. Study of laccase production and regulation in basidiomycetous fungi *Trametes hirsuta*. Vasina D.V., Loginov D.S., Koroleva O.V.; Oxizymes 2012, Марсель, Франция, p.118.
9. Сравнительное исследование транскриптома базидиального гриба *Trametes hirsuta*. Д.В. Васина, Д.С. Логинов, О.Н. Мустафаев, О.В. Королева. Материалы международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (к 100-летию со дня рождения академика Н.В. Турбина). Минск, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2012г, Стр. 27.
10. Intracellular laccase of basidiomycete *Trametes hirsuta*. D. Vasina, D. Loginov, L. Maloshenok and O. Koroleva, 38th Congress of European Biochemical Societies (FEBS), 2013; 280(1), 124.
11. Comparative transcriptome and gene expression analysis of laccase biosynthesis in white-rot fungi *Trametes hirsuta*. O. Koroleva, D. Vasina, O. Mustafaev, I. Goldenkova-Pavlova, 5th Congress of European Microbiologists (FEMS), 2013.
12. Выявление генов с дифференциальной экспрессией при индукции биосинтеза лакказы базидиального гриба *Trametes hirsuta*. D. V. Vasina, D.S. Loginov, O. Mustafaev, I.V. Goldenkova-Pavlova and O. V. Koroleva, Сборник тезисов докладов VII Московского международного конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития" 2013, стр.298-299.
13. Resolving Laccases of *Trametes Hirsuta*: Next Generation Sequencing Approches. A. R. Pavlov, L.G. Maloshenok, D. V. Vasina, K.V. Moiseenko, T.V. Fedorova, S.A. Bruskin, O.V. Koroleva. 1-4 Июля 2014, OXIZYMES 2014, Vienna, Австрия.
14. Expression analysis of laccase multigene family in *Trametes hirsuta*. D.V. Vasina, K.V. Moiseenko, O.V. Mosunova, T.V. Tyazhelova, O.V. Koroleva. 6th Congress of European microbiological societies (FEMS), 7-11 June 2015

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ten Have R., Teunissen P.J.M. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi // *Chem. Rev.* 2001. Vol. 101, № 11. P. 3397–3413.
2. Lundell T.K., Mäkelä M.R., Hildén K. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - Ecological, functional and phylogenetic review // *J. Basic Microbiol.* 2010. Vol. 50, № 1. P. 5–20.
3. Galagan J.E. et al. Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology // *Genome Research.* 2005. Vol. 15, № 12. P. 1620–1631.
4. Martinez D. et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. // *Nat. Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 6. P. 695–700.
5. Abbas A. et al. Fungal degradation of wood: Initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate // *Curr. Genet.* 2005. Vol. 47, № 1. P. 49–56.
6. Sato S. et al. Expression analysis of extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* grown on different liquid and solid substrates // *Microbiology.* 2007. Vol. 153, № 9. P. 3023–3033.
7. Wymelenberg A. Vanden et al. Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins // *Fungal Genet. Biol.* 2006. Vol. 43, № 5. P. 343–356.
8. Wymelenberg A. Vanden et al. Transcriptome and secretome analyses of *Phanerochaete chrysosporium* reveal complex patterns of gene expression // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75, № 12. P. 4058–4068.
9. Sato S. et al. The first genome-level transcriptome of the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on red oak // *Current Genetics.* 2009. Vol. 55, № 3. P. 273–286.
10. Martinez D. et al. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106, № 6. P. 1954–1959.
11. Floudas D. et al. The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes // *Science.* 2012. Vol. 336, № 6089. P. 1715–1719.
12. Stajich J.E. et al. Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107, № 26. P. 11889–11894.
13. Martin F. et al. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. // *Nature.* 2008. Vol. 452, № 7183. P. 88–92.

14. Куликова Н. А., Кляйн О. И., Степанова Е. В. К.О.В. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Vol. 47, № 6. P. 619–634.
15. Kirk T.K., Farrell R.L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. // *Ann. Rev. Microbiol.* 1987. Vol. 41. P. 465–505.
16. Eriksson K-E L., Blanchette R.A., Ander P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components // Eriksson KE L R A Blanchette P Ander Springer Ser. Wood Sci. Microb. Enzym. Degrad. Wood Wood Components Ix407p SpringerVerlag New York Inc Secaucus New Jersey USA Berlin Ger. Illus. 1990. P. IX+407P.
17. Tuomela M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review // *Bioresour. Technol.* 2000. Vol. 72, № 2. P. 169–183.
18. Kersten P., Cullen D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* // *Fungal Genet. Biol.* 2007. Vol. 44, № 2. P. 77–87.
19. Boerjan W., Ralph J., Baucher M. Lignin biosynthesis. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003. Vol. 54. P. 519–546.
20. Higuchi T. Look back over the studies of lignin biochemistry // *J. Wood Sci.* 2006. Vol. 52. P. 2–8.
21. Hofrichter M. et al. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 87, № 3. P. 871–897.
22. Leonowicz A. et al. Fungal laccase: Properties and activity on lignin // *J. Basic Microbiol.* 2001. Vol. 41, № 3-4. P. 185–227.
23. Mayer A.M., Staples R.C. Laccase: New functions for an old enzyme // *Phytochemistry.* 2002. Vol. 60, № 6. P. 551–565.
24. Ruiz-Dueñas F.J., Martínez Á.T. Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this // *Microb. Biotechnol.* 2009. Vol. 2, № 2 SPEC. ISS. P. 164–177.
25. Hammel K.E., Cullen D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008. Vol. 11, № 3. P. 349–355.
26. Hildén K., Hakala T.K., Lundell T. Thermotolerant and thermostable laccases // *Biotechnol. Lett.* 2009. Vol. 31, № 8. P. 1117–1128.
27. Guillén F. et al. Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. Vol. 383, № 1. P. 142–147.
28. Claus H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. // *Arch. Microbiol.* 2003. Vol. 179, № 3. P. 145–150.
29. Todd a E., Orengo C. a, Thornton J.M. Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 307, № 4. P. 1113–1143.

30. Kues U., Ruhl M. Multiple Multi-Copper Oxidase Gene Families in Basidiomycetes - What for? // *Curr. Genomics*. 2011. Vol. 12, № 2. P. 72–94.
31. Hoegger P.J. et al. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. // *FEBS J.* 2006. Vol. 273, № 10. P. 2308–2326.
32. Lahtinen M. et al. The effect of lignin model compound structure on the rate of oxidation catalyzed by two different fungal laccases // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2009. Vol. 57. P. 204–210.
33. Lahtinen M. et al. On the factors affecting product distribution in laccase-catalyzed oxidation of a lignin model compound vanillyl alcohol: experimental and computational evaluation. // *Org. Biomol. Chem.* 2013. Vol. 11, № 33. P. 5454–5464.
34. Schouten A. et al. Resveratrol acts as a natural antifungicide and induces self-intoxication by a specific laccase // *Mol. Microbiol.* 2002. Vol. 43, № 4. P. 883–894.
35. Gómez B.L., Nosanchuk J.D. Melanin and fungi. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2003. Vol. 16, № 2. P. 91–96.
36. Eisenman H.C. et al. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA // *Microbiology*. 2007. Vol. 153, № 12. P. 3954–3962.
37. Pukkila-Worley R. et al. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade // *Eukaryot. Cell*. 2005. Vol. 4, № 1. P. 190–201.
38. Kosman D.J. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. // *Mol. Microbiol.* 2003. Vol. 47, № 5. P. 1185–1197.
39. Larrondo L.F. et al. A Novel Extracellular Multicopper Oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with Ferroxidase Activity // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69, № 10. P. 6257–6263.
40. Rodríguez-Rincón F. et al. Molecular and structural modeling of the *Phanerochaete flavidobalva* extracellular laccase reveals its ferroxidase structure. // *Arch. Microbiol.* 2010. Vol. 192, № 11. P. 883–892.
41. De Silva D.M. et al. The FET3 gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270, № 3. P. 1098–1101.
42. Stoj C.S. et al. Structural basis of the ferrous iron specificity of the yeast ferroxidase, Fet3p // *Biochemistry*. 2006. Vol. 45. P. 12741–12749.
43. Shi X. et al. Fre1p Cu²⁺ reduction and Fet3p Cu¹⁺ oxidation modulate copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 50. P. 50309–50315.
44. Tsai H.F. et al. A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* // *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181, № 20. P. 6469–6477.
45. Clutterbuck A.J. Absence of laccase from yellow spored mutants of *Aspergillus nidulans* // *J. Gen. Microbiol.* 1972. Vol. 70. P. 423–435.

46. Langfelder K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi // *Fungal Genet. Biol.* 2003. Vol. 38, № 2. P. 143–158.
47. Messerschmidt A. *Multi-Copper Oxidases*. Singapore: World Scientific, 1997.
48. De Tullio M.C., Liso R., Arrigoni O. Ascorbic acid oxidase: An enzyme in search of a role // *Biol. Plant.* 2004. Vol. 48, № 2. P. 161–166.
49. Díaz-Vivancos P. et al. Characterization of the antioxidant system during the vegetative development of pea plants // *Biol. Plant.* 2010. Vol. 54, № 1. P. 76–82.
50. Murao S. et al. Isolation and Purification of Ascorbate Oxidase from *Acremonium Sp Hi-25* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1992. Vol. 56, № 6. P. 847–852.
51. Takeda K. et al. Cloning of a thermostable ascorbate oxidase gene from *Acremonium sp. HI-25* and modification of the azide sensitivity of the enzyme by site-directed mutagenesis // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1998. Vol. 1388, № 2. P. 444–456.
52. Sharma K.K., Kuhad R.C. Laccase: Enzyme revisited and function redefined // *Indian J. Microbiol.* 2008. Vol. 48, № 3. P. 309–316.
53. Courty P.E. et al. Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* // *New Phytol.* 2009. Vol. 182, № 3. P. 736–750.
54. Thurston C.F. The structure and function of fungal laccases // *Microbiology.* 1994. Vol. 140, № 1. P. 19–26.
55. Burke R.M., Cairney J.W.G. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. // *Mycorrhiza.* 2002. Vol. 12, № 3. P. 105–116.
56. Cho N.S. et al. The role of laccase from white rot fungi to stress conditions // *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 2009. Vol. 54, № 1. P. 81–83.
57. Theuerl S., Buscot F. Laccases: Toward disentangling their diversity and functions in relation to soil organic matter cycling // *Biol. Fertil. Soils.* 2010. Vol. 46. P. 215–225.
58. Kues U., Liu Y. Fruiting body production in basidiomycetes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. Vol. 54. P. 141–152.
59. Ohm R. a et al. Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. // *Nat. Biotechnol.* 2010. Vol. 28, № 9. P. 957–963.
60. Kilaru S., Hoegger P.J., Kues U. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. // *Curr. Genet.* 2006. Vol. 50, № 1. P. 45–60.
61. Pezzella C. et al. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. // *Curr. Genet.* 2009. Vol. 55, № 1. P. 45–57.

62. Lettera V. et al. Identification of a new member of Pleurotus ostreatus laccase family from mature fruiting body // Fungal Biol. 2010. Vol. 114, № 9. P. 724–730.
63. Giardina P. et al. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete Pleurotus ostreatus // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61, № 6. P. 2408–2413.
64. Giardina P. et al. The gene, protein and glycan structures of laccase from Pleurotus ostreatus. // Eur. J. Biochem. 1996. Vol. 235, № 3. P. 508–515.
65. Palmieri G. et al. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented Pleurotus ostreatus cultures // Enzyme Microb. Technol. 2003. Vol. 33, № 2-3. P. 220–230.
66. Giardina P. et al. Structural characterization of heterodimeric laccases from Pleurotus ostreatus. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 75, № 6. P. 1293–1300.
67. Kiiskinen L.L. Characterization and heterologous production of a novel laccase from Melanocarpus albomyces // VTT Publ. 2004. Vol. 2, № 556. P. 3–94.
68. Galhaup C. et al. Characterization of the major laccase isoenzyme from Trametes pubescens and regulation of its synthesis by metal ions // Microbiology. 2002. Vol. 148, № 7. P. 2159–2169.
69. Yaver D.S. et al. Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete Coprinus cinereus and heterologous expression of the laccase Lcc1 // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65, № 11. P. 4943–4948.
70. Collins P.J., Dobson A.D.W. Regulation of laccase gene transcription in Trametes versicolor // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63, № 9. P. 3444–3450.
71. Piscitelli A. et al. Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi // Curr. Genomics. 2011. Vol. 12, № 2. P. 104–112.
72. Janusz G. et al. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation // Enzyme Microb. Technol. Elsevier Inc., 2013. Vol. 52, № 1. P. 1–12.
73. Soden D.M., Dobson A.D.W. The use of amplified flanking region-PCR in the isolation of laccase promoter sequences from the edible fungus Pleurotus sajor-caju // J. Appl. Microbiol. 2003. Vol. 95. P. 553–562.
74. Levasseur A. et al. Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete Trichoderma reesei: a functional, phylogenetic and evolutionary study. // BMC Biochem. 2010. Vol. 11. P. 32.
75. Cañero D.C., Roncero M.I.G. Functional analyses of laccase genes from Fusarium oxysporum. // Phytopathology. 2008. Vol. 98, № 5. P. 509–518.
76. Canessa P. et al. The copper-dependent ACE1 transcription factor activates the transcription of the mco1 gene from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium // Microbiology. 2008. Vol. 154, № Pt 2. P. 491–499.

77. Litvintseva A.P., Henson J.M. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. Vol. 68, № 3. P. 1305–1311.
78. Gralla E.B. et al. ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991. Vol. 88, № 19. P. 8558–8562.
79. Uldschmid A. et al. Identification and functional expression of *tahA*, a filamentous fungal gene involved in copper trafficking to the secretory pathway in *Trametes versicolor*. // *Microbiology.* 2002. Vol. 148, № Pt 12. P. 4049–4058.
80. Xiao Y.Z. et al. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. Vol. 71, № 4. P. 493–501.
81. Galhaup C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens* // *Enzyme Microb. Technol.* 2002. Vol. 30, № 4. P. 529–536.
82. Fu Y.H., Marzluf G.A. *nit-2*, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990. Vol. 87, № 14. P. 5331–5335.
83. Rigling D., Van Alfen N.K. Regulation of laccase biosynthesis in the plant-pathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* by double-stranded RNA // *J. Bacteriol.* 1991. Vol. 173, № 24. P. 8000–8003.
84. Ramírez D. a et al. Effects of different wavelengths of light on lignin peroxidase production by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* grown in submerged cultures. // *Bioresour. Technol.* 2010. Vol. 101, № 23. P. 9213–9220.
85. Ronne H. Glucose repression in fungi // *Trends Genet.* 1995. Vol. 11, № 1. P. 12–17.
86. Janusz G., Rogalski J., Szczodrak J. Increased production of laccase by *Cerrena unicolor* in submerged liquid cultures // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007. Vol. 23, № 10. P. 1459–1464.
87. Marzluf G.A. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi // *Microbiol Rev.* 1981. Vol. 45, № 3. P. 437–461.
88. Boominathan K., Reddy C. a. cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992. Vol. 89, № 12. P. 5586–5590.
89. Strauss J. et al. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. // *Mol. Microbiol.* 1999. Vol. 32, № 1. P. 169–178.
90. Mach R.L. et al. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xyn1*) gene expression in *Trichoderma reesei*. // *Mol. Microbiol.* 1996. Vol. 21, № 6. P. 1273–1281.

91. Pall M.L. Adenosine 3',5'-phosphate in fungi // *Microbiol. Rev.* 1981. Vol. 45. P. 462–480.
92. Galhaup C., Haltrich D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. Vol. 56, № 1-2. P. 225–232.
93. Saparrat M. et al. Differential regulation of laccase gene expression in *Corioloropsis rigida* LPSC No. 232 // *Fungal Biol.* 2010. Vol. 114, № 11-12. P. 999–1006.
94. Palmieri G. et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66, № 3. P. 920–924.
95. Kagi J.H., Kojima Y. Chemistry and biochemistry of metallothionein // *Exp. Suppl.* 1987. Vol. 52. P. 25–61.
96. Culotta V.C., Hamer D.H. Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element. // *Mol. Cell. Biol.* 1989. Vol. 9, № 3. P. 1376–1380.
97. Okuyama M. et al. Effect of some heavy metal ions on copper-induced metallothionein synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // *Biometals.* 1999. Vol. 12, № 4. P. 307–314.
98. Haq F., Mahoney M., Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2003. Vol. 533, № 1-2. P. 211–226.
99. Gutiérrez J.C. et al. Ciliate metallothioneins: Unique microbial eukaryotic heavy-metal-binder molecules // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2011. Vol. 16, № 7. P. 1025–1034.
100. Zhou P.B., Thiele D.J. Isolation of a metal-activated transcription factor gene from *Candida glabrata* by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991. Vol. 88, № 14. P. 6112–6116.
101. Carrj M.T. et al. Evidence for co-regulation of Cu,Zn superoxide dismutase and metallothionein gene expression in yeast through transcriptional control by copper via the ACE 1 factor // *Febs Lett.* 1991. Vol. 278, № 2. P. 263–266.
102. Merchant S., Hill K., Howe G. Dynamic interplay between two copper-titrating components in the transcriptional regulation of *cyt c6*. // *EMBO J.* 1991. Vol. 10, № 6. P. 1383–1389.
103. Faraco V., Giardina P., Sannia G. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters // *Microbiology.* 2003. Vol. 149. P. 2155–2162.
104. Ogra Y. et al. Negative Regulatory Role of Sp1 in Metal Responsive Element-mediated Transcriptional Activation // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 19. P. 16534–16539.
105. Wang F. et al. Heat shock treatment improves *trametes versicolor* laccase production // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. Vol. 168, № 2. P. 256–265.
106. Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. Vol. 6, № 1. P. 79–87.

107. Lipford J.R., Deshaies R.J. Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. // *Nat. Cell Biol.* 2003. Vol. 5, № 10. P. 845–850.
108. Staszczak M. Proteasomal degradation pathways in *Trametes versicolor* and *Phlebia radiata* // *Enzyme Microb. Technol.* 2002. Vol. 30. P. 537–541.
109. Staszczak M. The role of the ubiquitin-proteasome system in the response of the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* to nitrogen deprivation // *Fungal Genet. Biol.* 2008. Vol. 45, № 3. P. 328–337.
110. Marzella L., Ahlberg J., Glaumann H. Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. // *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 1981. Vol. 36. P. 219–234.
111. Muratani M., Tansey W.P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. Vol. 4, № 3. P. 192–201.
112. Blaich R., Esser K. Function of enzymes in wood destroying fungi // *Arch. Microbiol.* 1975. Vol. 103, № 1. P. 271–277.
113. Schlosser D., Grey R., Fritsche W. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997. Vol. 47. P. 412–418.
114. Wood D. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus* // *J. Gen. Microbiol.* 1980. Vol. 117. P. 327–338.
115. Valášková V., Baldrian P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus* // *Res. Microbiol.* 2006. Vol. 157, № 2. P. 119–124.
116. Eggert C. et al. Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 376, № 3. P. 202–206.
117. Tetsch L., Bend J., Hölker U. Molecular and enzymatic characterisation of extra- and intracellular laccases from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila* // *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 2006. Vol. 90, № 2. P. 183–194.
118. Nagai M. et al. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: Purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies // *Microbiology.* 2003. Vol. 149. P. 2455–2462.
119. Thompson S.A., Golightly E.J., Yaver D.S. Nucleotide sequence of the *Aspergillus niger* *srpA* gene // *Gene.* 1995. Vol. 167, № 1-2. P. 337–338.
120. Kajino T. et al. Molecular cloning of a fungal cDNA encoding protein disulfide isomerase // *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994. Vol. 58, № 8. P. 1424–1429.
121. Lee B.R. et al. Cloning, characterization and overexpression of a gene (*pdiA*) encoding protein disulfide isomerase of *Aspergillus oryzae* // *J. Ferment. Bioeng.* 1996. Vol. 82, № 6. P. 538–543.

122. Saloheimo M., Lund M., Penttilä M.E. The protein disulphide isomerase gene of the fungus *Trichoderma reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source // *Mol. Gen. Genet.* 1999. Vol. 262, № 1. P. 35–45.
123. Van Gemeren I. a et al. The ER chaperone encoding *bipA* gene of black *Aspergilli* is induced by heat shock and unfolded proteins. // *Gene.* 1997. Vol. 198, № 1-2. P. 43–52.
124. Hijarrubia M.J. et al. Characterization of the *bip* gene of *Aspergillus awamori* encoding a protein with an HDEL retention signal homologous to the mammalian BiP involved in polypeptide secretion // *Curr. Genet.* 1997. Vol. 32, № 2. P. 139–146.
125. Veldhuisen G. et al. Isolation and analysis of functional homologues of the secretion- related SAR1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* from *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* // *Mol. Gen. Genet.* 1997. Vol. 256, № 4. P. 446–455.
126. Wösten H. a et al. Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. // *J. Gen. Microbiol.* 1991. Vol. 137, № 1 991. P. 2017–2023.
127. Nykanen M. et al. Expression and Secretion of Barley Cysteine Endopeptidase B and Cellobiohydrolase I in *Trichoderma reesei*. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol. 63, № 12. P. 4929–4937.
128. Harris S. et al. Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge // *Eukaryot Cell.* 2005. Vol. 4, № 2. P. 225–229.
129. Pakula T.M. et al. Monitoring the kinetics of glycoprotein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*: Cellobiohydrolase I (CBHI) as a model protein // *Microbiology.* 2000. Vol. 146, № 1. P. 223–232.
130. Nevalainen H., Peterson R. Making recombinant proteins in filamentous fungi- Are we expecting too much? // *Front. Microbiol.* 2014. Vol. 5, № FEB. P. 1–10.
131. Guillemette T. et al. Genomic analysis of the secretion stress response in the enzyme-producing cell factory *Aspergillus niger*. // *BMC Genomics.* 2007. Vol. 8. P. 158.
132. Valkonen M. et al. Spatially segregated SNARE protein interactions in living fungal cells // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 31. P. 22775–22785.
133. Bernasconi R., Molinari M. ERAD and ERAD tuning: Disposal of cargo and of ERAD regulators from the mammalian ER // *Current Opinion in Cell Biology.* 2011. Vol. 23, № 2. P. 176–183.
134. Wessels J.G.H. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi // *New Phytol.* 1993. Vol. 123, № 45. P. 397–413.
135. Preuss D. et al. Characterization of the *Saccharomyces* Golgi complex through the cell cycle by immunoelectron microscopy. // *Mol. Biol. Cell.* 1992. Vol. 3, № 7. P. 789–803.
136. Giraldo M.C. et al. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. // *Nat. Commun.* 2013. Vol. 4, № May. P. 1996.

137. Riquelme M. et al. Spitzenkorper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. // *Eukaryot. Cell*. 2007. Vol. 6, № 10. P. 1853–1864.
138. Koepke J. et al. The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2011. Vol. 10, № 12. P. M111.011213.
139. Oliveira D.L. et al. Where do they come from and where do they go: Candidates for regulating extracellular vesicle formation in fungi // *Int. J. Mol. Sci*. 2013. Vol. 14, № 5. P. 9581–9603.
140. Ding Y. et al. Unconventional protein secretion // *Trends Plant Sci*. 2012. Vol. 17, № 10. P. 606–615.
141. Robinson N.J., Winge D.R. Copper metallochaperones. // *Annu. Rev. Biochem*. 2010. Vol. 79. P. 537–562.
142. O'Halloran T. V., Culotta V.C. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions // *J. Biol. Chem*. 2000. Vol. 275, № 33. P. 25057–25060.
143. Dudev T., Lim C. Metal binding affinity and selectivity in metalloproteins: insights from computational studies. // *Annu. Rev. Biophys*. 2008. Vol. 37. P. 97–116.
144. Huffman D.L., O'Halloran T. V. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. // *Annu. Rev. Biochem*. 2001. Vol. 70. P. 677–701.
145. Himelblau E. et al. Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from *Arabidopsis*. // *Plant Physiol*. 1998. Vol. 117, № 4. P. 1227–1234.
146. Hirayama T. et al. *RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1*, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis* // *Cell*. 1999. Vol. 97, № 3. P. 383–393.
147. Payne a S., Gitlin J.D. Functional expression of the menkes disease protein reveals common biochemical mechanisms among the copper-transporting P-type ATPases. // *J. Biol. Chem*. 1998. Vol. 273, № 6. P. 3765–3770.
148. Uldschmid A., Dombi R., Marbach K. Identification and functional expression of *ctaA*, a P-type ATPase gene involved in copper trafficking in *Trametes versicolor* // *Microbiology*. 2003. Vol. 149, № 8. P. 2039–2048.
149. Pufahl R. et al. Metal Ion Chaperone Function of the Soluble Cu(I) Receptor *Atx1* // *Science* (80-). 1997. Vol. 278, № 5339. P. 853–856.
150. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. // *Chem. Rev*. 1996. Vol. 96, № 7. P. 2563–2606.
151. Rydén L.G., Hunt L.T. Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins. // *J. Mol. Evol*. 1993. Vol. 36, № 1. P. 41–66.
152. Palmieri G. et al. Purification , Characterization , and Functional Role of a Novel Extracellular Protease from *Pleurotus ostreatus* // *Society*. 2001. Vol. 67, № 6. P. 2754–2759.

153. Christensen N.J., Kepp K.P. Stability mechanisms of a thermophilic laccase probed by molecular dynamics. // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 4. P. e61985.
154. Rodgers C.J. et al. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? // *Trends Biotechnol.* 2010. Vol. 28, № 2. P. 63–72.
155. Slomczynski D., Nakas J.P., Tanenbaum S.W. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34 // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Vol. 61, № 3. P. 907–912.
156. Fukushima Y., Kirk T.K. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Vol. 61, № 3. P. 872–876.
157. Marques De Souza C.G., Peralta R.M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium // *J. Basic Microbiol.* 2003. Vol. 43. P. 278–286.
158. Koschorreck K. et al. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs // *Arch. Biochem. Biophys.* 2008. Vol. 474, № 1. P. 213–219.
159. Ranieri D. et al. Optimization of recombinant fungal laccase production with strains of the yeast *Kluyveromyces lactis* from the pyruvate decarboxylase promoter // *FEMS Yeast Res.* 2009. Vol. 9, № 6. P. 892–902.
160. Bohlin C. et al. Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006. Vol. 129-132. P. 195–214.
161. Limongi P. et al. Disulfide Bonds and Glycosylation in Fungal Peroxidases // *Eur. J. Biochem.* 1995. Vol. 227, № 1-2. P. 270–276.
162. Kukururinska M.A., Bergh M.L.B., Jackson B.J. Glycosylation in yeast // *Annu. Rev. Biochem.* 1987. Vol. 56. P. 915–944.
163. Wang J. et al. Identification of differentially expressed genes involved in laccase production in tropical white-rot fungus *Polyporus* sp. PG15 // *J. Basic Microbiol.* 2014. Vol. 54, № 2. P. 142–151.
164. Заикина Н.В., Галынкин В.А., А.Е. К. Основы биотехнологии высших грибов. Москва: Проспект науки, 2007.
165. Chen C., Chang H., Kirk T. Aromatic-acids produced during degradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium* // *Holzforschung.* 1982. Vol. 36, № 1. P. 3–9.
166. Kirk T. Toward elucidating the mechanism of action of the ligninolytic system in basidiomycetes. New York: : Forest Products Laboratory, Forest Service U.S. Dept. of Agriculture, 1981.
167. Kirk T. Ainsworth and Bisby's. Dictionary of the Fungi. 10th ed. Wallingford, Oxon.: CAB International Press, 2008. 771 p.

168. Marco-Urrea E., Reddy C.A. Degradation of Chloro-organic Pollutants by White Rot Fungi // Microbial Degradation of Xenobiotics. Environmental Science and Engineering. 2012. P. 31–66.
169. Mougin C., Boukcim H., C J. Soil bioremediation strategies based on the use of fungal enzymes. In: A. Singh et al. (eds.), 2009. 17123–149 p.
170. Hernández-Luna C.E., Gutiérrez-Soto G., Salcedo-Martínez S.M. Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico // World J. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 24, № 4. P. 465–473.
171. Baldrian P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi // Enzyme Microb. Technol. 2003. Vol. 32, № 1. P. 78–91.
172. Gabriel J. et al. Copper sorption by native and modified pellets of wood-rotting basidiomycetes // Lett. Appl. Microbiol. 2001. Vol. 32, № 3. P. 194–198.
173. Gutnick D.L., Bach H. Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000. Vol. 54, № 4. P. 451–460.
174. Nakajima A., Sakaguchi T. Accumulation of uranium by basidiomycetes // Appl Microbiol Biotechnol. 1993. Vol. 38. P. 574–578.
175. Gao D. et al. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control // Crit Rev Biotechnol. 2010. Vol. 30, № 1. P. 70–77.
176. Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents // Biotechnol. Adv. 2003. Vol. 22, № 1-2. P. 161–187.
177. Kilaru S. Identification of Fungal Multi-Copper Oxidase Gene Families: Overexpression and Characterization of *Coprinopsis cinerea* Laccases for Applications in Biotechnology. Göttingen: Cuvillier Verlag, 2006. 380 p.
178. Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties // FEMS Microbiol. Rev. 2006. Vol. 30, № 2. P. 215–242.
179. Gai Y.P. et al. Involvement of ligninolytic enzymes in degradation of wheat straw by *Trametes trogii* // J. Appl. Microbiol. 2014. Vol. 117, № 1. P. 85–95.
180. Yamanaka R. et al. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* ccb176 under different culture conditions. // Braz J Microbiol. 2008. Vol. 39, № 1. P. 78–84.
181. Бабицкая В.Г., Щерба В.В. Образование биологически активных веществ грибами *Coriolus hirsutus* на гетерогенных средах // Микробиология. 1987. Vol. 56, № 4. P. 600–607.
182. Reinhammar B.R. Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. Vol. 275, № 2. P. 245–259.

183. Garzillo A.M. et al. Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii* // *J. Protein Chem.* 2001. Vol. 20, № 3. P. 191–201.
184. Xu F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, № 2. P. 924–928.
185. Solomon E.I. et al. Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2001. Vol. 40, № 24. P. 4570–4590.
186. Kosman D.J. Multicopper oxidases: A workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2010. Vol. 15, № 1. P. 15–28.
187. Giardina P. et al. Laccases: A never-ending story // *Cell. Mol. Life Sci.* 2010. Vol. 67, № 3. P. 369–385.
188. Kumar S.V.S. et al. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. Vol. 83, № 4. P. 386–394.
189. Canters G.W., Gilardi G. Engineering type 1 copper sites in proteins // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 325, № 1. P. 39–48.
190. Xu F. et al. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. // *Biochem. J.* 1998. Vol. 334 (Pt 1. P. 63–70.
191. Nakatani M. et al. Two laccase isoenzymes and a peroxidase of a commercial laccase-producing basidiomycete, *Trametes* sp. Ha1 // *N. Biotechnol.* 2010. Vol. 27, № 4. P. 317–323.
192. Christensen N.J., Kepp K.P. Setting the stage for electron transfer: Molecular basis of ABTS-binding to four laccases from *Trametes versicolor* at variable pH and protein oxidation state // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2014. Vol. 100. P. 68–77.
193. Areskog D. et al. Oxidative polymerisation of models for phenolic lignin end-groups by laccase // *Holzforschung.* 2010. Vol. 64, № 1. P. 21–34.
194. Areskog D. et al. Investigation of the molecular weight increase of commercial lignosulfonates by laccase catalysis. // *Biomacromolecules.* 2010. Vol. 11, № 4. P. 904–910.
195. Crestini C., Jurasek L., Argyropoulos D.S. On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. // *Chemistry.* 2003. Vol. 9, № 21. P. 5371–5378.
196. Hibbett D.S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi // *Mycol. Res.* 2007. Vol. 111, № 5. P. 509–547.
197. Soden D.M., Dobson a. D.W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju* // *Microbiology.* 2001. Vol. 147. P. 1755–1763.
198. Mansur M., Suárez T., González A.E. Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197) // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. Vol. 64, № 2. P. 771–774.

199. Necochea R. et al. Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. Vol. 244, № 2. P. 235–241.
200. Mäkelä M.R. et al. Expression and molecular properties of a new laccase of the white rot fungus *Phlebia radiata* grown on wood // *Current Genetics*. 2006. Vol. 50, № 5. P. 323–333.
201. Valderrama B. et al. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases // *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 2003. Vol. 84, № 4. P. 289–299.
202. Majcherczyk A., Johannes C., Huttermann A. Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. Vol. 51, № 2. P. 267–276.
203. Vasina D. V. et al. The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: Genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction // *Biochimie*. 2015. Vol. 116. P. 154–164.
204. Zhang H. et al. Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. Vol. 73. P. 89–94.
205. Klonowska A. et al. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete c30 // *Eur. J. Biochem.* 2002. Vol. 269. P. 6119–6125.
206. Klonowska A. et al. LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast // *Enzyme Microb. Technol.* 2005. Vol. 36, № 1. P. 34–41.
207. Tong P. et al. High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp. // *Biotechnol. Lett.* 2007. Vol. 29, № 2. P. 295–301.
208. Terrón M.C. et al. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on *lcc* gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. // *Fungal Genet. Biol.* 2004. Vol. 41, № 10. P. 954–962.
209. Сивочуб О.А. Каталог культур базидиомицетов Коллекции Ботанического Института им. В.Л. Комарова РАН. С–П: Наука, 1992. 25 p.
210. Koroljova-Skorobogat'ko O. V et al. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1998. Vol. 28 (Pt 1). P. 47–54.
211. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. Киев: “Наукова думка,” 1982. 550 p.
212. Dantán-González E. et al. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat // *Int Microbiol.* 2008. Vol. 11, № 3. P. 163–169.
213. Martínez M.J. et al. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. // *Eur. J. Biochem.* 1996. Vol. 237, № 2. P. 424–432.

214. Godliving M., Yoshitoshi N. Characterization of Lignocellulosic Enzymes from White-rot Fungus *Phlebia chrysocreas* Isolated from a Marine Habitat // *J. Eng Appl Sci.* 2007. Vol. 2, № 10. P. 1501–1508.
215. Guillén F., Martínez A., Martínez M. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. // *Eur J Biochem.* 1992. Vol. 209, № 2. P. 603–611.
216. Wessel D., Flügge U.I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. // *Anal. Biochem.* 1984. Vol. 138, № 1. P. 141–143.
217. Zorn H. et al. The secretome of *Pleurotus sapidus* // *Proteomics.* 2005. Vol. 5, № 18. P. 4832–4838.
218. Fragner D. et al. Optimized protocol for the 2-DE of extracellular proteins from higher basidiomycetes inhabiting lignocellulose // *Electrophoresis.* 2009. Vol. 30, № 14. P. 2431–2441.
219. Kniemeyer O. et al. Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* // *Curr. Genet.* 2006. Vol. 49, № 3. P. 178–189.
220. O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250. P. 4007–4021.
221. Zhu Y. et al. Reverse transcriptase template switching: A SMART (TM) approach for full-length cDNA library construction // *Biotechniques.* 2001. Vol. 30, № 4. P. 892–897.
222. Diatchenko L. et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. Vol. 93, № 12. P. 6025–6030.
223. Lukyanov, SA et al. Highly efficient subtractive hybridisation of cDNA. // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 1994. Vol. 20, № 6. P. 701–704.
224. Rebrikov D. V et al. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 20. P. E90.
225. Grabherr M.G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. // *Nat. Biotechnol.* 2011. Vol. 29, № 7. P. 644–652.
226. Einax E., Voight K. Oligonucleotide primers for the universal amplification of B-tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi // *Org. Divers. Evol.* 2003. Vol. 3. P. 185–194.
227. Wang F. et al. Ultrasound-intensified laccase production from *Trametes versicolor* // *Ultrason. Sonochem.* 2013. Vol. 20, № 1. P. 118–124.
228. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, № 5. P. 1792–1797.

229. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. // *Nucleic Acids Res.* 1994. Vol. 22, № 22. P. 4673–4680.
230. Guindon S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0 // *Syst. Biol.* 2010. Vol. 59, № 3. P. 307–321.
231. Chevenet F. et al. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. // *BMC Bioinformatics.* 2006. Vol. 7. P. 439.
232. Stothard P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. // *Biotechniques.* 2000. Vol. 28, № 6. P. 1102, 1104.
233. Gasteiger E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server // *Proteomics Protoc. Handb.* 2005. P. 571–607.
234. Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 215, № 3. P. 403–410.
235. Gupta R., Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function // *Pacific Symp. Biocomput.* 2002. Vol. 322. P. 310–322.
236. Vasina D. V, Loginov D.S., Koroleva O. V. Comparative proteomic study of the basidiomycete *Trametes hirsuta* grown on different substrates. // *Biochem. Biokhimiia.* 2013. Vol. 78, № 5. P. 477–484.
237. Koroleva O. V. et al. Laccase and Mn-peroxidase production by *Coriolus hirsutus* strain 075 in a jar fermentor // *J. Biosci. Bioeng.* 2002. Vol. 93, № 5. P. 449–455.
238. Stepanova E. V. et al. Fungal Decomposition of Oat Straw during Liquid and Solid-State Fermentation // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2003. Vol. 39, № 1. P. 65–74.
239. Koroleva O. et al. Production of lignin modifying enzymes by co-cultivated White-rot fungi *Cerrena maxima* and *Coriolus hirsutus* and characterization of laccase from *Cerrena maxima* // *Enzyme Microb. Technol.* 2002. Vol. 30, № 4. P. 573–580.
240. Dong Y.C. et al. Biodegradation of chestnut shell and lignin-modifying enzymes production by the white-rot fungi *Dichomitus squalens*, *Phlebia radiata* // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2014. Vol. 37, № 5. P. 755–764.
241. Akpınar M., Urek R. Extracellular ligninolytic enzymes production by *Pleurotus eryngii* on agroindustrial wastes // *Prep Biochem Biotechnol.* 2014. Vol. 44, № 8. P. 772–781.
242. Varela E., Martínez A.T., Martínez M.J. Southern blot screening for lignin peroxidase and aryl-alcohol oxidase genes in 30 fungal species // *J. Biotechnol.* 2000. Vol. 83, № 3. P. 245–251.
243. George S.J. et al. Reversible alkaline inactivation of lignin peroxidase involves the release of both the distal and proximal site calcium ions and bishistidine co-ordination of the haem. // *Biochem. J.* 1999. Vol. 344 Pt 1. P. 237–244.

244. Shimizu M., Wariishi H. Development of a sample preparation method for fungal proteomics // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. Vol. 247, № 1. P. 17–22.
245. Herbert B.R. et al. Improved 2-DE of microorganisms after acidic extraction // *Electrophoresis*. 2006. Vol. 27, № 8. P. 1630–1640.
246. Wildgruber R. et al. Web-based two-dimensional database of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using immobilized pH gradients from pH 6 to pH 12 and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry // *Proteomics*. 2002. Vol. 2, № 6. P. 727–732.
247. Damerval C. et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins // *Electrophoresis*. 1986. Vol. 7, № 1. P. 52–54.
248. Vincent D. et al. Secretome of the free-living mycelium from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* // *J. Proteome Res.* 2012. Vol. 11, № 1. P. 157–171.
249. Salvachúa D. et al. Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. // *Biotechnol. Biofuels*. 2013. Vol. 6, № 1. P. 115.
250. MacDonald J. et al. Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carnosae* during growth on coniferous and deciduous wood // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. Vol. 77, № 10. P. 3211–3218.
251. Alfaro M. et al. Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi // *J. Proteomics*. Elsevier B.V., 2014. Vol. 102. P. 28–43.
252. Faraco V. et al. Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007. Vol. 23, № 6. P. 889–893.
253. Passardi F. et al. PeroxiBase: The peroxidase database // *Phytochemistry*. 2007. Vol. 68, № 12. P. 1605–1611.
254. Sugano Y. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009. Vol. 66, № 8. P. 1387–1403.
255. Jia L.D. et al. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica* // *J. Basic Microbiol.* 2005. Vol. 45, № 3. P. 190–198.
256. Lorenzo M., Moldes D., Sanromán M. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes // *Chemosphere*. 2006. Vol. 63, № 6. P. 912–917.
257. De Souza C.G.M. et al. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds // *J. Basic Microbiol.* 2004. Vol. 44, № 2. P. 129–136.
258. Lebrun J.D. et al. Secretion profiles of fungi as potential tools for metal ecotoxicity assessment: A study of enzymatic system in *Trametes versicolor* // *Chemosphere*. 2011. Vol. 82, № 3. P. 340–345.

259. Levin L., Forchiassin F., Ramos A. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii* // *Mycologia*. 2002. Vol. 94, № 3. P. 377–383.
260. Alvarez J. et al. Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispora* is mediated by an ACE1-like copper-fist transcription factor. // *Fungal Genet Biol*. 2009. Vol. 46, № 1. P. 104–111.
261. Morgenstern I., Klopman S., Hibbett D.S. Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the agaricomycetes // *J. Mol. Evol.* 2008. Vol. 66, № 3. P. 243–257.
262. Kim Y. et al. Cloning of a manganese peroxidase cDNA gene repressed by manganese in *Trametes versicolor*. // *J. Microbiol.* 2005. Vol. 43, № 6. P. 569–571.
263. Hori C. et al. Genomewide analysis of polysaccharides degrading enzymes in 11 white- and brown-rot Polyporales provides insight into mechanisms of wood decay. // *Mycologia*. 2013. Vol. 105, № 6. P. 1412–1427.
264. Seidl V. et al. The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. // *BMC Genomics*. 2008. Vol. 9. P. 327.
265. Peterson R., Nevalainen H. *Trichoderma reesei* RUT-C30--thirty years of strain improvement. // *Microbiology*. 2012. Vol. 158, № Pt 1. P. 58–68.
266. Barr B.K. et al. Identification of two functionally different classes of exocellulases // *Biochemistry*. 1996. Vol. 35, № 2. P. 586–592.
267. Galan B. et al. Production, purification, and properties of an endo-1,3-beta-glucanase from the basidiomycete *Agaricus bisporus* // *Curr. Microbiol.* 1999. Vol. 38, № 3. P. 190–193.
268. Sakamoto Y., Nakade K., Konno N. An endo- β -1,3-glucanase, GLU1, from *Lentinula edodes* fruiting body belongs to a new glycoside hydrolase family. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. № September.
269. Adav S.S., Ravindran A., Sze S.K. Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass // *J. Proteomics*. 2012. Vol. 75, № 5. P. 1493–1504.
270. Sabotič J. et al. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity // *J. Biotechnol.* 2007. Vol. 128, № 2. P. 297–307.
271. Dosoretz C.G. et al. Protease-mediated degradation of lignin peroxidase in liquid cultures of *Phanerochaete chrysosporium* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. Vol. 56, № 11. P. 3429–3434.
272. Wood J., Wood P. Evidence that cellobiose – quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium* is a breakdown product of cellobiose oxidase // *Biochim Biophys Acta*. 192AD. Vol. 1119, № 1. P. 90–96.

273. Habu N. et al. Release of the FAD domain from cellobiose oxidase by proteases from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 327, № 2. P. 161–164.
274. Eggert C. et al. Cleavage of *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase (CDH) by three endogenous proteases // *Biotechnology in the pulp and paper industry. Recent advances in applied and fundamental research* / ed. Srebotnik E., Messner K. Vienna, 1996. P. 551–554.
275. Gonzalez-Fernandez R., Jorriñ-Novó J. V. Contribution of Proteomics to the Study of Plant Pathogenic Fungi // *J. Proteome Res.* 2011. Vol. 11, № 1. P. 3–16.
276. Espino J.J. et al. The *Botrytis cinerea* early secretome // *Proteomics.* 2010. Vol. 10, № 16. P. 3020–3034.
277. Baccelli I. et al. Cerato-platanin shows expansin-like activity on cellulosic materials // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 98, № 1. P. 175–184.
278. Kämper J. et al. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. // *Nature.* 2006. Vol. 444, № 7115. P. 97–101.
279. Chen H. et al. Distribution and Bioinformatic analysis of cerato-platanin protein family in *Dikarya*. // *Mycologia.* 2013. Vol. 105, № 6. P. 1479–1488.
280. De Oliveira A. et al. The structure of the elicitor ceratoplatanin (CP), the first member of the CP fungal protein family, reveals a double psi b-barrel fold and carbohydrate binding. // *J Biol Chem.* 2011. Vol. 286, № 20. P. 17560–17568.
281. Gaderer R., Bonazza K., Seidl-Seiboth V. Cerato-platanins: A fungal protein family with intriguing properties and application potential // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 98, № 11. P. 4795–4803.
282. Baccelli I. Cerato-platanin family proteins: one function for multiple biological roles? // *Front Plant Sci.* 2015. Vol. 5, № January. P. 2013–2016.
283. Blaich R., Esser K. Function of enzymes in wood destroying fungi. Multiple forms of laccase in white rot fungi // *ArchMicrob.* 1975. Vol. 103. P. 271–277.
284. Salvado J.C., Labarère J. Protein mapping and genome expression variations in the basidiomycete *Agrocybe aegerita* // *Theor. Appl. Genet.* 1989. Vol. 78, № 4. P. 505–512.
285. Wilkins M.R., Williams K.L. Cross-species protein identification using amino acid composition, peptide mass fingerprinting, isoelectric point and molecular mass: a theoretical evaluation. // *J. Theor. Biol.* 1997. Vol. 186, № 1. P. 7–15.
286. Bukau B., Horwich A.L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines // *Cell.* 1998. Vol. 92, № 3. P. 351–366.
287. Mayer M.P., Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism // *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. Vol. 62, № 6. P. 670–684.

288. Wegele H. et al. Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 28. P. 25970–25976.
289. Rebrikov D. V. Identification of Differential Genes by Suppression Subtractive Hybridization: IV. Mirror Orientation Selection (MOS) // *CSH Protoc.* 2008. Vol. 2008. P. pdb prot4858.
290. Haas B.J. et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. // *Nat. Protoc.* 2013. Vol. 8, № 8. P. 1494–1512.
291. Du Plessis L., Skunca N., Dessimoz C. The What, Where, How and Why of Gene Ontology: A Primer for Bioinformaticians // *Brief. Bioinform.* 2011. Vol. 12, № 6. P. 723–735.
292. Joseph-Horne T., Hollomon D.W., Wood P.M. Fungal respiration: A fusion of standard and alternative components // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2001. Vol. 1504, № 2-3. P. 179–195.
293. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. Мембранная Биоэнергетика. Москва: Издательство Московского университета, 2010. 368 p.
294. Eggert C. et al. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. Vol. 64, № 5. P. 1766–1772.
295. Yaver D.S., Golightly E.J. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family // *Gene.* 1996. Vol. 181, № 1-2. P. 95–102.
296. Mansur M. et al. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197 // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol. 63, № 7. P. 2637–2646.
297. Jolivalt C. et al. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. Vol. 66, № 4. P. 450–456.
298. Bertrand T. et al. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics // *Biochem.* 2002. Vol. 41. P. 7325–7333.
299. Yaver D.S. et al. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. Vol. 62, № 3. P. 834–841.
300. Morohoshi N., Shibuya Y. Properties of the phenoloxidases secreted by *Coriolus versicolor* in wood-meal medium // *Japan Wood Res. Soc.* 1989. Vol. 35. P. 342–347.
301. Xiao Y.Z. et al. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. Vol. 60. P. 700–707.

302. Kojima Y. et al. Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265, № 25. P. 15224–15230.
303. Rebrikov D. et al. Laccase of the lignolytic fungus *Trametes hirsuta*: Purification and characterization of the enzyme, and cloning and primary structure of the gene. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. Vol. 42. P. 564–572.
304. Dedeyan B. et al. Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66, № 3. P. 925–929.
305. Klonowska a, Le Petit J., Tron T. Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. Vol. 200, № 1. P. 25–30.
306. Fujihiro S. et al. Metabolism of hydroxylated PCB congeners by cloned laccase isoforms. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. Vol. 82, № 5. P. 853–860.
307. Eggert C., Temp U., Eriksson K.E.L. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 407, № 1. P. 89–92.
308. Record E. et al. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme.
309. Antorini M. et al. Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 2002. Vol. 1594, № 1. P. 109–114.
310. Li Q. et al. Overexpression and characterization of laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. // *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 2014. Vol. 50. P. 163–170.
311. Temp U., Zierold U., Eggert C. Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. // *Gene.* 1999. Vol. 236, № 1. P. 169–177.
312. Ong E., Pollock W.B.R., Smith M. Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor* // *Gene.* 1997. Vol. 196. P. 113–119.
313. Xiao Y.Z. et al. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. // *Mycologia.* 2004. Vol. 96, № 1. P. 26–35.
314. Hong Y.Z. et al. Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes* sp. 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris* // *Curr. Microbiol.* 2007. Vol. 54, № 4. P. 260–265.
315. Kollmann A. et al. Oligomeric compounds formed from 2,5-xylidine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. Vol. 68, № 2. P. 251–258.
316. Yoshitake a. et al. N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor* // *J. Gen. Microbiol.* 1993. Vol. 139, № 1. P. 179–185.

317. Kudriavtseva O. a et al. Proteolytic enzymes of the fungi: extracellular proteases of xylotrophic basidiomycetes // *Mikrobiologiya*. 2008. Vol. 77, № 6. P. 725–737.
318. Mtui G., Nakamura Y. Continuous production of lignin-degrading enzymes by *Bjerkandera adusta* immobilized on polyurethane foam // *Biotechnol. Lett.* 2002. Vol. 24, № 21. P. 1743–1747.
319. Hoegger P.J. et al. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. // *FEBS J.* 2006. Vol. 273, № 10. P. 2308–2326.
320. Kawai S., Umezawa T., Higuchi. Oxidation of methoxylated benzyl alcohols by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde // *Wood Res.* 1989. Vol. 76. P. 10–16.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю – доктору биологических наук, профессору Ольге Владимировне Королевой за предоставленную возможность реализации моих научных изысканий на базе лаборатории, руководство и внимание к работе. Также выражаю искреннюю признательность кандидату биологических наук Татьяне Владимировне Тяжеловой и кандидату технических наук Татьяне Васильевне Федоровой за мудрые советы, помощь и поддержку на всех этапах подготовки диссертации. Автор выражает огромную благодарность доктору биологических наук Ирине Васильевне Голденковой-Павловой и сотрудникам ее группы за помощь при проведении совместных исследований.

Благодарю всех коллег и друзей за внимание к моей работе и всестороннюю поддержку, обеспечившую возможность ее выполнения.