

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА

Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

по диссертации Васиной Дарьи Владимировны на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 22 декабря 2015 г. протокол № 6 о присуждении Васиной Дарье Владимировне, гражданство Российская Федерация, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертационная работа «Изучение организации мультигенного семейства лакказ базидиального гриба *Trametes hirsuta* – эффективного деструктора лигнина» в виде рукописи по специальности 03.01.04 Биохимия выполнена на базе лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Диссертация принята к защите 20 октября 2015 г. протокол № 2 диссертационным советом Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2). Совет утвержден РОСОБРНАДЗОРМ Министерства образования РФ, приказ №2249-1602 от 16.11.2007г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказами Минобрнауки России от 13 февраля 2013г. №74/нк; от 10 февраля 2014г. №55/нк и учетом переименования Совета от 30 сентября 2015г. №1166/нк.

Соискатель Васина Дарья Владимировна, 1987 года рождения, в 2010 г. окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» по специальности «Технология бродильных производств и виноделие». В период с ноября 2010 г. по ноябрь 2013 г. обучалась в очной аспирантуре Федерального

государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, выполняя диссертационную работу в лаборатории молекулярных основ биотрансформаций. Васина Д.В. работает младшим научным сотрудником лаборатории молекулярных основ биотрансформаций в Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор Королева Ольга Владимировна, заведующая лабораторией молекулярных основ биотрансформаций, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Позднякова Наталия Николаевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИФБРМ РАН, г. Саратов);

Яненко Александр Степанович, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора, заведующий лабораторией генетических систем биодegradации Государственного научного центра РФ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика, г. Москва);

дали положительные отзывы о диссертации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (г. Пущино) дал положительное заключение (заключение составлено Лисовым Александром Викторовичем, кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории микробной энзимологии ИБФМ РАН, Захаровой Мариной Викторовной, кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории молекулярной микробиологии ИБФМ РАН, Вайнштейном Михаилом Борисовичем, доктором биологических наук, заведующим лабораторией физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН). В своем заключении ведущая организация указала, что диссертация является законченным научным исследованием, содержит ценные результаты для биохимии и удовлетворяет

требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24.09.2013г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а Васина Д.В. заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что Позднякова Н.Н. является специалистом в области изучения базидиальных грибов, биохимических аспектов их взаимодействия с окружающей средой и биодegradации загрязнителей (автор более 70 научных работ по данным тематикам); Яненко А.С. является известным ученым в области современных направлений и подходов промышленной биотехнологии, обладает значительным опытом в разработке ферментных препаратов и биокатализаторов (является автором многочисленных статей и значительного списка патентов по биохимической и микробиологической тематикам). Выбор ведущей организации связан с активно ведущимися исследованиями в области изучения ферментных систем катаболизма устойчивых соединений у микроорганизмов, ферментных систем грибов, способных разрушать устойчивые и токсичные соединения природного и не природного происхождения.

Соискатель имеет 14 опубликованных работ по теме диссертации, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, удовлетворяющих требованиям пп. 11 и 13 «Положения присуждению учёных степеней» утверждённого Правительством РФ от 24.09.2013 г. № 842.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

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. Vol. 116. P. 154–164.
2. Loginov D.S., Vavilova E.A., Savinova O.S., Abyanova A.R., Chulkin A.M., 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. 2014. Vol. 61, No 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. Т. 78, №5. С. 477–484.

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, № 10, С. 1149–1154.

Результаты работы также были представлены на 9 международных и 1 Всероссийской конференциях. В публикациях отражены экспериментальные работы, проведенные в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие положительные отзывы с замечаниями:

В отзыве официального оппонента доктора биологических наук Яненко А.С. приведены следующие замечания: «Диссертант недостаточно уделяет внимания факту отсутствия лакказ в составе внутриклеточных белков *Trametes hirsuta* и не анализирует причины такого результата: связано ли это с низкой разрешающей способностью метода анализа или отражает особенности биогенеза лакказ; представлены рисунки высокого качества, однако очень небольших размеров, что затрудняет их анализ (например, рис. 11 и рис. 28)».

В отзыве официального оппонента доктора биологических наук Поздняковой Н. Н. указаны следующие замечания: «Во введении диссертации не отражена практическая значимость проведенных исследований. Вместе с тем в автореферате работы написано, что «Выявленные закономерности регуляции экспрессии и продукции индивидуальных изоферментов лакказ могут служить основой для получения рекомбинантных ферментов с заданными свойствами, адаптированных под конкретные биотехнологические процессы. Полученные данные могут быть использованы для повышения эффективности технологий биоконверсии растительного сырья на основе грибов рода *Trametes*». На мой взгляд, следовало также указать, что экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе могут быть использованы в организациях биологического и биотехнологического профилей, занимающихся исследованием подобных грибов, а также при чтении курсов лекций по биохимии в ВУЗах; Не понятно, почему для тестирования активности двух разных ферментов, Mn-независимой пероксидазы и лигнин пероксидазы, автором использован фактически один и тот же метод – окисление вератрилового спирта. Хорошо известно, что ряд субстратов, окисляемых грибными пероксидазами может перекрываться. Так, например, лигнин пероксидаза окисляет вератриловый спирт, но не ионы Mn^{2+} ; Mn-зависимая пероксидаза окисляет

ионы Mn^{2+} и фенольные соединения, такие как 2,6-диметоксифенол, каталитическая активность этого фермента строго зависит от Mn^{2+} ; гибридная (Mn-независимая) пероксидаза окисляет вератриловый спирт, ионы Mn^{2+} , и 2,6-диметоксифенол как в присутствии Mn^{2+} , так и без Mn^{2+} (Wong 2009). На мой взгляд, более корректно для тестирования активностей лигнинолитических пероксидаз было бы использование вератрилового спирта – для лигнин пероксидазы, 2,6-диметоксифенола в присутствии Mn^{2+} – для Mn-зависимой пероксидазы и 2,6-диметоксифенола без Mn^{2+} – для Mn-независимой пероксидазы, как это принято в соответствующей литературе; В работе присутствуют опечатки и неточности. Так, например, на странице 14 упоминается «версатилпероксидаза», от англ. *versatile peroxidase* – фермент, который в русскоязычной литературе называют гибридной пероксидазой. Далее по тексту этот же фермент называется Mn-независимой пероксидазой, что вносит некоторую путаницу».

В отзыве от ведущей организации - Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) приведены следующие замечания: «Несмотря на то, что работа написана грамотным научным языком, имеется ряд заимствований и жаргонизмов, которые было бы логичнее заменить на русскоязычные аналоги. В наибольшей степени это относится к генетической части работы. Так, например, встречающееся в тексте словосочетание «забанкированные последовательности» уместнее заменить на «депонированные». Также можно найти адекватные аналоги таким названиям, как «драйвер» и «трейсер», используемые при описании процедуры супрессионной вычитающей гибридизации; для идентифицированных внутриклеточных белков при исследовании протеома получены такие низкие значения Score, что следовало бы более подробно обсудить, а также привести подробный анализ количества пептидов и их аминокислотных последовательностей, по которым проводилась идентификация; в геномах ряда исследованных базидиомицетов обнаружено значительно больше генов лакказ, чем в работе диссертанта (5 генов). Следовало бы уточнить, является ли это ограничением используемых методов, результатом изучения именно этого штамма или объясняется другими причинами».

На автореферат поступили следующие положительные отзывы:

– Ведущего научного сотрудника кафедры микробиологии биологического

факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», доктора биологических наук **Стояновой Л.Г.** и заведующего кафедрой микологии и альгологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», доктора биологических наук **Куракова А.В.**;

– Главного научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук профессора, доктора биологических наук **Пирузян Э.С.**;

– Ведущего научного сотрудника кафедры молекулярной биологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кандидата биологических наук **Рубцова М.А.**;

– Директора Международного биотехнологического центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», доктора химических наук, профессора **Вржеша П.В.** В отзыве были сделаны следующие замечания: «в автореферате слабо освещены данные по изучению «динамики активности лигнолитических ферментов» (нет сводных таблиц). Кроме того, не обсуждается, почему для идентифицированных внутриклеточных белков получены такие низкие значения Score (табл. 2)»;

– Ведущего научного сотрудника лаборатории биохимии грибов ФГБУН Ботанического института им. В. Л. Комарова Российской академии наук, кандидата химических наук **Беловой Н.В.** В качестве замечания в отзыве указано «отсутствие раздела Материалы и методы, представленного одним абзацем в разделе «Объем и структура работы», что затрудняет восприятие деталей проделанной работы. Отсутствуют также ссылки на цитируемых авторов, поэтому не всегда понятно, где представлены оригинальные данные диссертанта, а где – литературный материал. Кроме того, приводится пожелание автору быть аккуратнее в использовании современных терминов, таких как транскриптом, протеом, секретом, частое употребление которых не всегда уместно. Например, на стр. 4 написано: «Показано, что в секрете *T. hirsuta* при культивировании на ЛЦ среде продуцируется два

изофермента LacA и LacC». Понятно, что эта фраза в такой трактовке некорректна, и слово «секретом» здесь явно лишнее»;

– Профессора кафедры химической энзимологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», доктора химических наук **Клячко Н.Л.** В отзыве приведено следующее замечание: «осталась неясной причина такого интересного факта, что ионы меди индуцируют продукцию внутриклеточных белков грибом *T. hirsuta* в глюкозо-пептонной среде и не индуцируют при культивировании на лигноцеллюлозном субстрате. Целесообразно было бы привести более подробное обсуждение этого явления. Отмечены также некоторые стилистические погрешности, например: «Среди белков, изменяющих уровень продукции, не были выявлены внутриклеточные лакказы...» (стр.12) при формальном прочтении по правилам русского языка смысл предложения становится совсем не таким, какой в него вкладывает автор»;

– И.о. зав. кафедрой биотехнологии и биотехнических систем Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова», кандидата технических наук **Аксенова А.С.** и профессора кафедры биотехнологии и биотехнических систем Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова», доктора биологических наук, профессора **Новожилова Е.В.** В отзыве имеется следующее замечание: «В разделе «Практическая значимость работы» возможность использования полученных фундаментальных результатов на практике ограничивается лишь упоминанием отличительных особенностей в синтезе карбогидраз изучаемого гриба среди других грибов белой гнили. Целесообразно было бы уточнить, в чем конкретно может состоять новая технология биоконверсии с использованием потенциала *Trametes hirsuta* и для каких видов сырья она предлагается»;

– Ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции ФГБУН Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, доктора биологических наук **Новиковой Г.В.** В своем отзыве Новикова Г.В. отмечает, что «в отличие от большинства авторефератов диссертаций,

в настоящем труде практически нет ссылок на работы других авторов, а имеющиеся ссылки оформлены в «странном» формате: без указания года публикации. Хотя из параграфа «Объем и структура работы» следует, что в диссертации имеется глава, в которой автор приводит сведения о материалах и методах исследования, в автореферате они лишь перечислены. Тогда как хотелось бы знать, какие интернет ресурсы использовала Д.В. Васина, например, для идентификации белков, какова повторяемость результатов, получаемых при анализе секретомов и протеомов *Trametes hirsuta*, кем «ранее показана активация шаперонов St11 (далее по тексту на стр. 11)». В отзыве приводится уточняющий вопрос, связанный с перспективами биотехнологического использования результатов исследования: Являются ли катионы меди единственными и наиболее эффективными агентами, посредством которых можно усилить работу лакказы? Могут ли быть найдены альтернативные природные медиаторы, которые лишены токсических эффектов, связанных с использованием солей тяжелых металлов?».

В дискуссии приняли участие:

доктор биологических наук, профессор Шишкин Сергей Сергеевич, заведующий лабораторией биомедицинских исследований Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

доктор биологических наук, профессор Капрельянц Арсений Сумбатович, заведующий лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

доктор биологических наук, профессор Юрина Надежда Петровна, заведующая лабораторией биоэнергетики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие основные результаты:

- Показано, что основными ферментами, продуцируемыми базидиомицетом *T. hirsuta* на глюкозо-пептонной среде и среде с внесением лигноцеллюлозного субстрата, являются гликозид-гидролазы различных семейств, пептидазы, лакказы и гемовые пероксидазы. Оксидоредуктазы образуют наиболее обширную группу

среди секретируемых ферментов. Множественные изоформы/изоферменты лакказ и марганец-независимых пероксидаз играют основную роль в процессе деградации лигнина;

- Показано, что на транскрипционном уровне ионы меди влияют на процессы метаболизма углеводов: цикл трикарбоновых кислот, гликолиз/глюконеогенез, пентозофосфатный путь, глиоксилатный цикл. Установлено изменение экспрессии генов, кодирующих ферменты, которые участвуют в окислительном фосфорилировании, метаболизме пуриновых и пиримидиновых оснований;
- Установлено, что 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.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- Охарактеризован ферментный состав лигнин-модифицирующей системы базидиомицета *Trametes hirsuta* в разных условиях культивирования, ее качественные и количественные изменения при внесении индукторов;
- Охарактеризованы изменения на уровне внутриклеточных белков *T. hirsuta* и транскрипции генов при внесении индуктора (ионов меди) при культивировании базидиомицета;
- Установлен минимальный состав мультигенного семейства лакказ базидиомицета *T. hirsuta*;
- Показано, что члены мультигенного семейства лакказ *T. hirsuta* характеризуются дифференциальной экспрессией генов в зависимости от условий и времени культивирования, потенциально обладают различными биохимическими, каталитическими и функциональными свойствами.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

- Изучены закономерности регуляции биогенеза изоферментов лакказ *T. hirsuta*. Полученные данные могут служить основой для разработки технологии получения рекомбинантных ферментов с заданными свойствами, адаптированных

под конкретные биотехнологические процессы;

- Охарактеризованы особенности состава секретируемых ферментов *T. hirsuta*, значимые для повышения эффективности технологий биоконверсии растительного сырья на основе грибов рода *Trametes* (переработка отходов деревообрабатывающей промышленности с повышенным содержанием галактоманнанов, например лиственницы сибирской);
- Используемые в работе методы обеспечили получение результатов, характеризующихся научной новизной, что позволяет использовать основные положения диссертационной работы для подготовки курса лекций для биологических факультетов университетов, химико-технологических и педагогических вузов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- Используемые методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, результаты получены на современном оборудовании и хорошо воспроизводимы;
- Выводы диссертационной работы четко сформулированы, отражают наиболее значимые результаты и полностью подтверждены экспериментальными данными;
- Полученные соискателем результаты согласуются с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации.

Личный вклад соискателя состоит:

- В получении исходных экспериментальных данных для последующего анализа секретома, протеома и транскриптома базидиомицета *T. hirsuta* и анализе научной литературы по тематике исследования;
- В обработке и интерпретации экспериментальных данных;
- В участии в апробации результатов исследования (участие в конференциях);
- В подготовке к публикации в рецензируемых научных изданиях материалов, отражающих основные научные результаты диссертации.

Данные исследования и полученные результаты оригинальны, характеризуются научной новизной и охватывают основные аспекты поставленной научной задачи.

На заседании 22 декабря 2015 г. диссертационным советом принято решение присудить Васиной Дарье Владимировне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 18 докторов наук (докторов химических наук – 4, докторов биологических наук - 14 по специальности рассматриваемой диссертации), участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени - 19, против присуждения ученой степени - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Заместитель председателя
диссертационного совета
ФИЦ Биотехнологии РАН
доктор биологических наук, профессор

 Крицкий М.С.

Ученый секретарь
диссертационного совета
ФИЦ Биотехнологии РАН
кандидат биологических наук



Орловский А.Ф.

«22» декабря 2015

